

DOCKET NO.

192 [REDACTED] US0PCT

416 Rec'd PCT [REDACTED] 09 JUN 2000

09/555529

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Patricia KANNOUCHE, et al.

SERIAL NUMBER: NEW U.S. PCT APPLICATION (based on PCT/FR98/02667)

FILED: HEREWITH

FOR: SEQUENCES ENCODING A KIN17 PROTEIN AND USES THEREOF

**REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

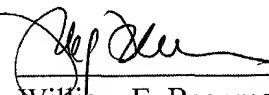
In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850



William E. Beaumont
Attorney of Record
Registration No. 30,996

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

TRAITE DE L'OPERATION EN MATERIE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 août 1999 (06.08.99)	en sa qualité d'office élu
Demande internationale n° PCT/FR98/02667	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/35P
Date du dépôt international (jour/mois/année) 09 décembre 1998 (09.12.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 09 décembre 1997 (09.12.97)
Déposant	KANNOUCHE, Patricia etc

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

25 juin 1999 (25.06.99)

[] dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite

a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32,2b).

<p>Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse</p> <p>no de télecopieur: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>Antonia Muller</p> <p>no de téléphone: (41-22) 338.83.38</p>
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interinal Application No
PCT/FR 98/02667A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/47 A61K38/17 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P. KANNOUCHE ET AL: "Overexpression of KIn17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells" BIOCHIMIE, vol. 79, no. 9-10, October 1997, pages 599-606, XP002076394 * whole document in particular pages 600 and 601	2-4, 15-17, 27
A		1,6-14, 18-21, 23,31 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

15 April 1999

03/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/FR 98/02667

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 706 487 A (COMMISARIAT A L' ENERGIE ATOMIQUE) 23 December 1994 cited in the application see claims; figures 1,8; examples 1-3,7 see page 6, line 17 - page 7 see page 8, line 25 - line 33 see page 8, line 34 - page 9, line 30 see page 6, line 19 - page 7, line 36 see page 5, line 10 - line 20 see page 10, line 13 - page 11, line 10 ---	1,6
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Differential expression of the hskin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin" ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 289, no. 8, July 1997, pages 448-456, XP002076395 cited in the application see abstract see page 455, left-hand column see page 453, right-hand column see page 451, right-hand column see page 449, left-hand column ---	7-14,31, 32 1,15,23, 24
A	A. MAZIN ET AL: "kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 22, no. 20, 1994, pages 4335-4341, XP002076396 OXFORD GB cited in the application see page 4336 see page 4337, right-hand column - page 4338, left-hand column ---	2-5, 15-18,31
X	M.D. ADAMS ET AL: "EST63674 Jurkat T-cells V Homo sapiens cDNA5' end similar to zinc finger protein KIN17" EMBL DATABASE ENTRY HSZZ60420, ACCESSION NUMBER AA355283, 18 April 1997, XP002099852 see abstract & M.D. ADAMS ET AL: "initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence" NATURE., vol. 377, 1995, pages 3-174, LONDON GB ---	6
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/02667

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.F. ANGULO ET AL: "Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 19, no. 19, 1991, pages 5117-5123, XP002076397 OXFORD GB cited in the application see the whole document	1,6,27
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation" RADIATION RESEARCH, vol. 147, no. 4, April 1997, pages 442-450, XP002076398 cited in the application see the whole document	7-14
A	J.F. ANGULO ET AL: "Identification of a mouse cDNA fragment whose expressed polypeptide reacts with anti-Reca antibodies" BIOCHIMIE, vol. 73, no. 2-3, March 1991, pages 251-256, XP002076423 cited in the application see page 255; figure 3 see page 254	23,24
A	A. TISSIER ET AL: "Molecular cloning and characterization of the mouse Kin17 gene coding for a Zn-finger protein that preferentially recognizes Bent DNA" GENOMICS, vol. 38, no. 2, 1 December 1996, pages 238-242, XP002099853 see the whole document	6,31
T	P. KANNOUCHE ET AL: "The nuclear concentration of Kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation" CARCINOGENESIS, vol. 19, no. 5, May 1998, pages 781-789, XP002076399	1,6-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 98/02667

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2706487 A	23-12-1994	NONE	

W/V

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 30 MARS 2000

WPO

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

17 T

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2315.WO	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/02663	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/12/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 08/12/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB B62B7/08		
Déposant AMPAFRANCE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I Base du rapport
- II Priorité
- III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV Absence d'unité de l'invention
- V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI Certains documents cités
- VII Irrégularités dans la demande internationale
- VIII Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 28/06/1999	Date d'achèvement du présent rapport 27.03.00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epru d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Ferranti, M N° de téléphone +49 89 2399 8846

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR98/02663

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-20 version initiale

Revendications. N°:

1-28 version initiale

Dessins, feuilles:

1/9-9/9 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

3. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a

- limité les revendications.
- payé des taxes additionnelles.
- payé des taxes additionnelles sous réserve.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02663

ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.

2. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.

il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

toutes les parties de la demande.

les parties relatives aux revendications n°s .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

voir feuille séparée

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

1. Cette administration chargée de l'examen préliminaire international estime que la demande ne satisfait pas à l'exigence d'unité d'invention telle que définie à la Règle 13 du PCT; elle émet néanmoins une opinion écrite basée sur la totalité de la demande (Règle 68(2) du PCT).

En particulier, le jeu de revendications 1 à 28 tel que déposé comporte les **trois** inventions suivantes incluses dans la demande:

Invention 1 (décrite dans les revendications 1 à 8)

Ces revendications définissent une poussette pliante, du type présentant deux bras-poussoirs, ayant comme caractéristique particulière des éléments de support du hamac coulissants le long des bras-poussoirs. Cette caractéristique permet un pliage compact de la poussette résultant en un encombrement inférieur à celui des poussettes connues.

Invention 2 (décrite dans les revendications 9 à 18)

L'objet de ces revendications défini une poussette pliante, du type présentant deux bras-poussoirs comportant comme caractéristique particulière un arceau de maintien qui se plie et se met en position automatiquement. Cette caractéristique simplifie la manipulation de la poussette, le pliage et le dépliage se faisant en une seule opération.

Invention 3 (décrite dans les revendications 19 à 28)

Ces revendications concernent une poussette pliante, du type présentant deux bras-poussoirs ayant comme caractéristique particulière des moyens de sécurité comprenant des éléments de blocage du coulissemement des bras-poussoirs le long des piétements. Cette caractéristique résout le problème d'empêcher le repliement accidentel de la poussette lorsqu'un enfant est présent dans le hamac.

2. Les trois inventions séparées susmentionnées ne sont pas liées entre elles de sorte à former un seul concept inventif général (règle 13.1 PCT). Elles comportent des problèmes techniques différents et qui ne sont pas résolus par des caractéristiques particulières communes.

En effet, il n'y a pas de correspondance entre les caractéristiques techniques particulières de ces inventions: l'objet de l'invention 1 est un élément coulissant de support du hamac, l'objet de l'invention 2 concerne un arceau de maintient et de protection de l'enfant transporté dans la poussette tandis que l'objet de l'invention 3 se réfère à des moyens de sécurité contre le repliage intempestif de la poussette. Par conséquent ces trois inventions ne sont pas liées entr' elles de sorte à former un seul concept inventif général.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

3. Il est fait référence au document suivant:

D1 = FR-A-2 693 162

4. Le document D1 est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet des revendications 1, 9, 19 et 28. Le document en question en expose les caractéristiques suivantes (les références entre parenthèses s'appliquent à ce document):

"Poussette pliante, du type présentant deux bras-poussoirs (8a, 8b) susceptibles de coulisser sensiblement parallèlement à des piétements (2a, 2b) du châssis de ladite poussette, entre deux positions extrêmes:
- une position déployée, dans laquelle lesdits bras-poussoirs (8a, 8b) sont déployés, ladite poussette développant un hamac (nacelle 32) prêt à recevoir un enfant, et

- une position pliée, dans laquelle lesdits bras-poussoirs (8a, 8b) sont au moins partiellement ramenés le long desdits piétements (2a, 2b), de façon à réduire l'encombrement de ladite poussette",

qui correspondent aux préambules des revendications 1, 9 et 19. La poussette décrite dans le document D1 comporte aussi un dispositif de verrouillage en position déployée (voir page 11, lignes 26-29), ce qui correspond au préambule de la revendication 28.

Les objets des revendications 1, 9, 19 et 28 diffèrent donc de la poussette pliante connue du D1. L'objet de ces revendications est donc nouveau (article 33(2) PCT).

5. Les problèmes que les inventions revendiquées dans la présente demande se proposent de résoudre doivent être vus dans la réalisation d'une poussette pliante capable d'être pliée simplement et de façon particulièrement compacte, ainsi que d'être équipée d'un arceau de maintien qui se met automatiquement en position et pouvant aussi assurer à l'enfant une sécurité contre tout repliage intempestif.

Les solutions de ces problèmes, telles que proposées dans les revendications 1, 9, 19 et 28 de la présente demande, peuvent être considérées comme impliquant une activité inventive (article 33(3) PCT).

En effet, la combinaison des caractéristiques de la revendication 1 et en particulier la solidarisation du hamac aux bras poussoir au moyen d'éléments mobiles en translation n'est pas comprise dans l'état de la technique connu et n'en découle pas à l'évidence.

Il en est de même pour la combinaison des caractéristiques de la revendication 9, en particulier les moyens de guidage et de maintien assurant le positionnement automatique de l'anneau de maintien objet de la revendication 9.

Aussi les caractéristiques des revendications 19 et 28, en particulier les éléments de blocage montés sur un bras poussoir et sur le piétement correspondant, ne

sont pas comprises dans l'état de la technique divulgué dans le rapport de recherche.

6. Les revendications 2 à 8 ainsi que les revendications 10 à 18 et les revendications 20 à 27 dépendent respectivement des revendications 1, 9 et 19 et satisfont donc également, en tant que revendications dépendantes, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

7. Les caractéristiques figurant dans les revendications ne comportent pas de signes de référence mis entre parenthèses (règle 6.2 b) PCT).
8. L'objet de la revendication 9 étant une poussette, la partie caractérisante devrait se référer à "...ce qu'elle comprend ..."

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BL0cp263/35P	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après
Demande internationale n° PCT/FR 98/ 02667	Date du dépôt international(jour/mois/année) 09/12/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 09/12/1997
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

suggérée par le déposant.

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

—
Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

/FR 98/02667

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/12 C12Q1/68

C07K14/47

A61K38/17

A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	P. KANNOUCHE ET AL: "Overexpression of KIn17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells" BIOCHIMIE, vol. 79, no. 9-10, octobre 1997, pages 599-606, XP002076394 * le document en entier plus particulièrement pages 600 et 601*	2-4, 15-17, 27
A	---	1, 6-14, 18-21, 23, 31
		-/-



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/05/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Cornec, N

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

/FR 98/02667

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 706 487 A (COMMISARIAT A L' ENERGIE ATOMIQUE) 23 décembre 1994 cité dans la demande voir revendications; figures 1,8; exemples 1-3,7 voir page 6, ligne 17 - page 7 voir page 8, ligne 25 - ligne 33 voir page 8, ligne 34 - page 9, ligne 30 voir page 6, ligne 19 - page 7, ligne 36 voir page 5, ligne 10 - ligne 20 voir page 10, ligne 13 - page 11, ligne 10	1,6
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Differential expression of the hsKin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin" ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 289, no. 8, juillet 1997, pages 448-456, XP002076395 cité dans la demande voir abrégé voir page 455, colonne de gauche voir page 453, colonne de droite voir page 451, colonne de droite voir page 449, colonne de gauche	7-14, 31, 32 1, 15, 23, 24
A	A. MAZIN ET AL: "kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 22, no. 20, 1994, pages 4335-4341, XP002076396 OXFORD GB cité dans la demande voir page 4336 voir page 4337, colonne de droite - page 4338, colonne de gauche	2-5, 15-18, 31
X	M.D. ADAMS ET AL: "EST63674 jurkat T-cells V Homo sapiens cDNA5' end similar to zinc finger protein KIN17" EMBL DATABASE ENTRY HSZZ60420, ACCESSION NUMBER AA355283, 18 avril 1997, XP002099852 voir abrégé & M.D. ADAMS ET AL: "initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence" NATURE., vol. 377, 1995, pages 3-174, LONDON GB	6
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

T/FR 98/02667

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J.F. ANGULO ET AL: "Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2 , encoding a new DNA-binding protein" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 19, no. 19, 1991, pages 5117-5123, XP002076397 OXFORD GB cité dans la demande voir le document en entier ---	1,6,27
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation" RADIATION RESEARCH, vol. 147, no. 4, avril 1997, pages 442-450, XP002076398 cité dans la demande voir le document en entier ---	7-14 23,24
A	J.F. ANGULO ET AL: "Identification of a mouse cDNA fragment whose expressed polypeptide reacts with anti-Reca antibodies" BIOCHIMIE, vol. 73, no. 2-3, mars 1991, pages 251-256, XP002076423 cité dans la demande voir page 255; figure 3 voir page 254 ---	6,31
A	A. TISSIER ET AL: "Molecular cloning and characterization of the mouse Kin17 gene coding for a Zn-finger protein that preferentially recognizes Bent DNA" GENOMICS, vol. 38, no. 2, 1 décembre 1996, pages 238-242, XP002099853 voir le document en entier ---	1,6-14
T	P. KANNOUCHE ET AL: "The nuclear concentration of Kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation" CARCINOGENESIS, vol. 19, no. 5, mai 1998, pages 781-789, XP002076399 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 98/02667

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2706487	A 23-12-1994	NONE	

24°) Utilisation selon la revendication 23, pour la préparation d'un médicament inhibant la prolifération cellulaire, notamment destiné au traitement des maladies dans lesquelles on observe une hyperprolifération cellulaire.

5 25°) Utilisation d'une protéine kin17 de mammifère ou d'un fragment de protéine selon l'une quelconque des revendications 21 et 22, pour la préparation d'un médicament contrôlant la fertilité.

26°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 23 à 25, caractérisée en ce que ladite séquence est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:22, 23, 25, 26, 35 et 36.

10 27°) Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il inclut une séquence codant pour une protéine kin17 de mammifère ou un fragment de celle-ci sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 2, 3, 33 et 34.

15 28°) Vecteur d'expression selon la revendication 27, caractérisé en ce que ladite séquence codant pour ladite protéine kin17 ou ledit fragment de celle-ci est fusionnée avec un gène qui code pour une protéine fluorescente.

29°) Utilisation d'un vecteur d'expression incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 2, 3, 24, 33 et 34, pour la préparation d'un médicament contrôlant la prolifération cellulaire.

20 30°) Utilisation d'un vecteur d'expression incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 2, 3, 24, 33 et 34, comme outil de détection, notamment pour visualiser les sites et la progression de la réparation de l'ADN et les centres de biosynthèse intranucléaire.

25 31°) Utilisation du fragment compris entre les aminoacides 55-235, de préférence le fragment compris entre les aminoacides 129 et 228 d'une protéine kin17 de mammifère pour la régulation de l'interaction protéine-ADN courbe.

32°) Réactifs de détection d'une séquence nucléique codant pour une protéine kin17 de mammifère ou un fragment modifié de ces séquences, caractérisés en ce qu'ils incluent les séquences SEQ ID NO:4-21, 33 et 34 ainsi que les fragments A de 453 pb, B de 1265 pb et C de 224 pb, éventuellement marqués.

1 / 28

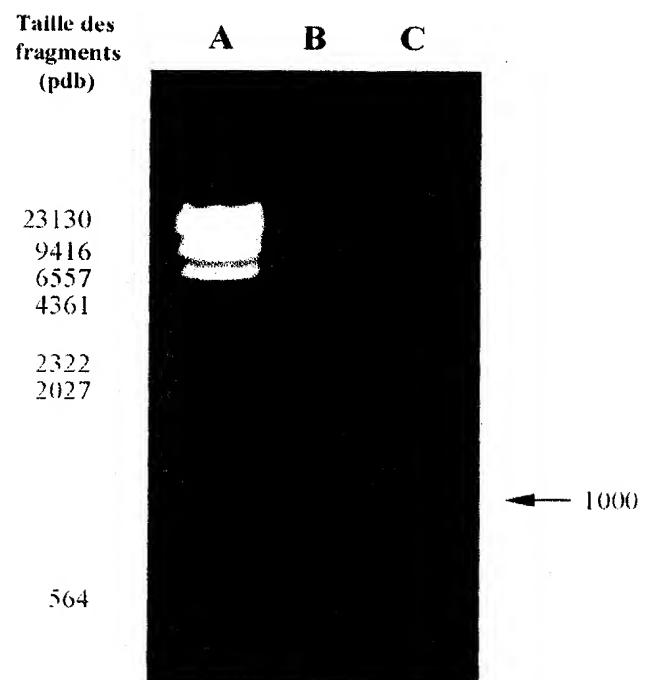


FIGURE 1

2/28

HsKin-mmKin pep	16 10 1997	16 00	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
hsKin17.pep	MGKSDFLSPK AIANRIKSKG LQKLRWYQCM CQKQCRDENG FKCHCMSESH	QROLLASEN PQQFMDYFSE EFRNDFLELL RRRFGTKRVH NNIVYNEYIS	*									
mmKin17.pep	MGKSDFLSPK AIANRIKSKG LQKLRWYQCM CQKQCRDENG FKCHCMSESH	QROLLASEN PQQFMDYFSE EFRNDFLELL RRRFGTKRVH NNIVYNEYIS	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
hsKin17.pep	HREHIIHMNAT QWETLTDFTK WLGREGLCKV DETPKGWIQ YIDRDPETIR	ROLELEKKK QDLDEEKTA KFIEEQVRGG LEGKEQEVPT FTELSRENDE	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
mmKin17.pep	HREHIIHMNAT QWETLTDFTK WLGREGLCKV DETPKGWIQ YIDRDPETIR	ROLELEKKK QDLDEEKTA KFIEEQVRGG LEGKEQEVPT FTELSRENDE	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
hsKin17.pep	EKVTFNLNSKG AGSSSGATSS KSSTLGPSSAL KTIGSASAVK RKESSQSSTQ	SKEKKKKKSA LDEIMETEEE KKRTARTDYN LQPEIIIVKII TKKLGEKYHK	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
mmKin17.pep	EKVTFNLNSKG AGSSAGATTS KSSSLGPSSAL KLLGSAASGK RKESSQSSTQ	AQPAKKKKSA LDEIMELEEE KKRTARTDAN LQPGIVVKII TKKLGEKYHK	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
hsKin17.pep	KKAVKEVID KYTAVVKMD SGDRLKLDDQT HLETVIAPG KRLVLYNGGY	RGNEGTLESI NEKTFSATIV IETGPLKGR VEGIQYEDIS KLA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
mmKin17.pep	KKGVVKEVID RYTAVVKMTD SGDRLKLDDQT HLETVIAPG KRLVLYNGGY	RGNEGTLESI NEKAFSATIV IETGPLKGR VEGIQYEDIS KLA	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
hsKin17.pep	<==	<==										
mmKin17.pep	<==	<==										

3/28

l5Kin17-nmKin17	16 10 1997 15 59	30	40	50	60	70	80	90	100
l5Kin17 . seq	TTATTGAGC TCGGTACCCG GGGATCCGAT TAGAAAGTGA	10	20	30	40	50	60	70	80
nmKin17 . seq	GGTCTCCCGT GGAAAGTCGG ATTTCCTAAC TCCCAGGCT ATGCCAAACA			*	*	*	*	*	*
l5Kin17 . seq	ATG GCGAAAGTCGG ATTTCCTAG CCCAAAGGCC ATGCCAAATA								
nmKin17 . seq	CGATCAAGTC CAAGGGCTCT CAGAAAGCTAC GCTGGTATTG CCAGATGTGC CAGAAGCAGT GCCGGGACGA GAATGGCTTT AAGTGTCAATT GTATGTCCGA	110	120	130	140	150	160	170	180
l5Kin17 . seq	*	*	*	*	*	*	*	*	*
nmKin17 . seq	GAATTAAGTC CAAAGGGCTC CAGAAAGCTTC GCTGGTACTG CCAGATGTGC CAAAGCAAT GCCGGGACGA GAATGGCTTT AAGTGTCAATT GTATGTCTGA	210	220	230	240	250	260	270	280
l5Kin17 . seq	ATCTCATCAG AGACAACAT TGCTGGCTTC AGAAAATTCCT CAGCAGTTA TGGATTATT TICAGAGAA TTCCGAAATG ACTTCTAGA ACTTCTCAGG			*	*	*	*	*	*
nmKin17 . seq	*	*	*	*	*	*	*	*	*
l5Kin17 . seq	ATCTCATCAA AGACAACATGT TGCTGGCTTC AGAAAACCCCT CAGCAGTTA TGGATTATT TICAGAGAA TTCCGAAATG ACTTCTGAGG	310	320	330	340	350	360	370	380
nmKin17 . seq	AGACGCTTTC GCAC TAAAGG GGTCCACAAAC AACATTGTCT ACAACGATAA CATCAGCCAC CGAGAGCACA TCCACATGAA TGCCACTCAG TGGAAACTC			*	*	*	*	*	*
l5Kin17 . seq	CGACGCTTTC GCAC TAAAGG GGTCCACAAAC AACATTGTCT ACAACGATAA CATCAGCCAC CGAGAGCACA TCCACATGAA CGCTAACCCAG TGGAGACAC								
nmKin17 . seq	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500								
l5Kin17 . seq	TGACGTATT TACTAAGTGG CTGGCGAGG AAGGCTTGTG CAAAGTGAC GAGACACAA AAGGCTGGTA TATTCACTGAC ATAGACAGGG ACCCAGAAAC			*	*	*	*	*	*
nmKin17 . seq	TGACCGGACTT TACCAAGTGG CTGGCGAGG AGGGCTTGTG TAAAGTGGAT GAGACACGA AAGGCTGGTA CAITCACTGAC ATAGACAGGG ACCCAGAAAC								

nsKin17.seq	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
	TATCCGGCGG CAACTGAAAC TGAGAAAAA * * * * *		GAAGGAGG GACCTTGATG ATGAGAAA AACTGCCAAA TTATGAG * * * * *			ACCACTGAG AGCACTGAG AAGAGGCCCTG * * *				
nmKin17.seq		CATCCGTCGG CAACTGAAAT TAGAAMAAA * * * * *	GAAGGAGCA GATCTGGACG ATGAGAAA AACTGCCAAG TTCAATTGAG * * * * *			AGCAGGTGAG AGCAGGTGAG AAGAGGCCCTG * * *				
nsKin17.seq	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
	GAAGGGAAAG AACAGGAGGT CCTCTACTTT * * * * ** *	ACGGAATTAA GCAGAGAAA TGATGAGAG * * * * *	AAAGTCACGT TTAAATTGAG TAAAGGAGCA TTAGCTCAT * * * * *							
nmKin17.seq		GAAGGGAAAG ACCAGGAGAC ACCCTTTT * * * * *	ACAGAACTTA GCCGAGAAA TGAGGAAGAA AAAGTTACGT TCAATCTGAA * * * * *			TAAGGAGCA TAAAGGAGCC GGTGGCTCAG * * * * *				
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
nsKin17.seq										
	CCGGAGCAAC ATCTTCAAG TCAAGTACTC * * * * *		TTGGACCGAG TGGCACTGAAG ACGATAGGA * * * * *			GTTCAAGCATC AGTGAACGA AAAGAACCTT CCAGAGCIC * * * * *				
nmKin17.seq		CGGGAGCTAC AACATCCAAG TCAAGCTCTT * * * * *	TTGGGACCAAG TGGCACTGAAG CTGGCTGGGA * * * * *			CGGGAAACGG AAAGAGCTT TAAAGGAGCT * * * * *				

FIGURE 2B (suite)

5 / 28

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

A

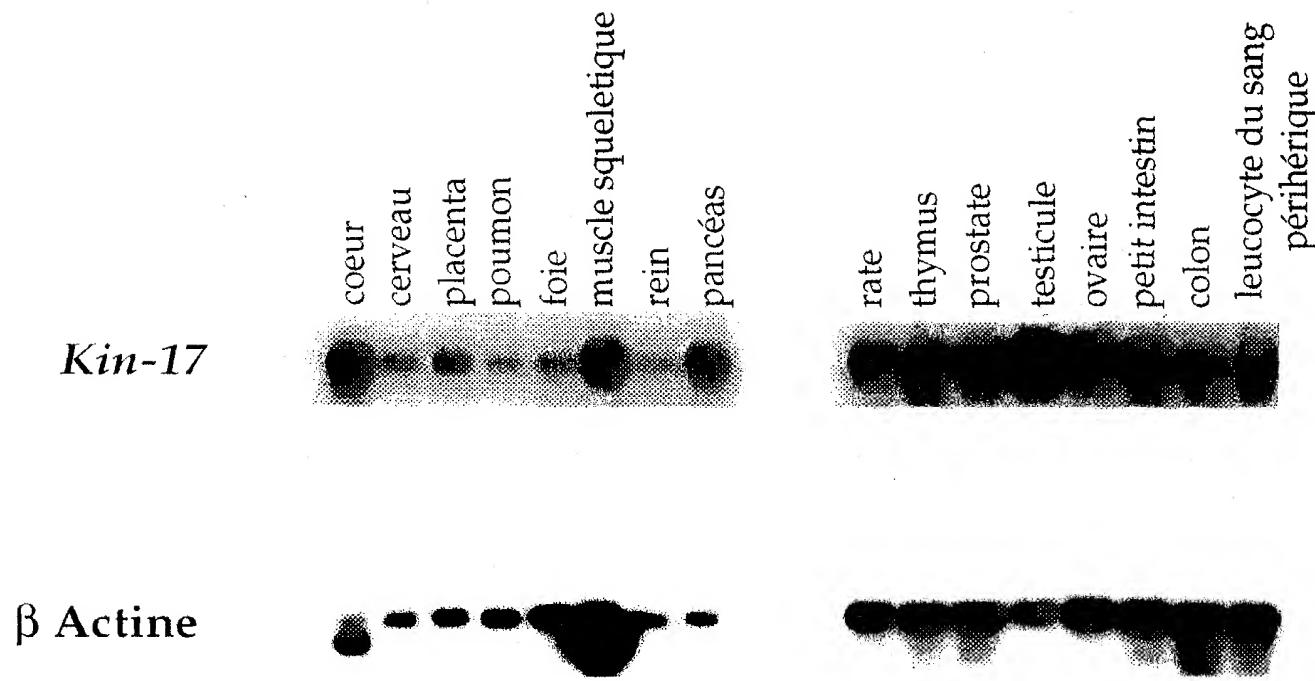


FIGURE 3A

7 / 28

B

Kin-17

HL-60
HeLa S3
K-562
Molt-4
Raji
SW480
A 549
G 361



β Actine



FIGURE 3B

8 / 28

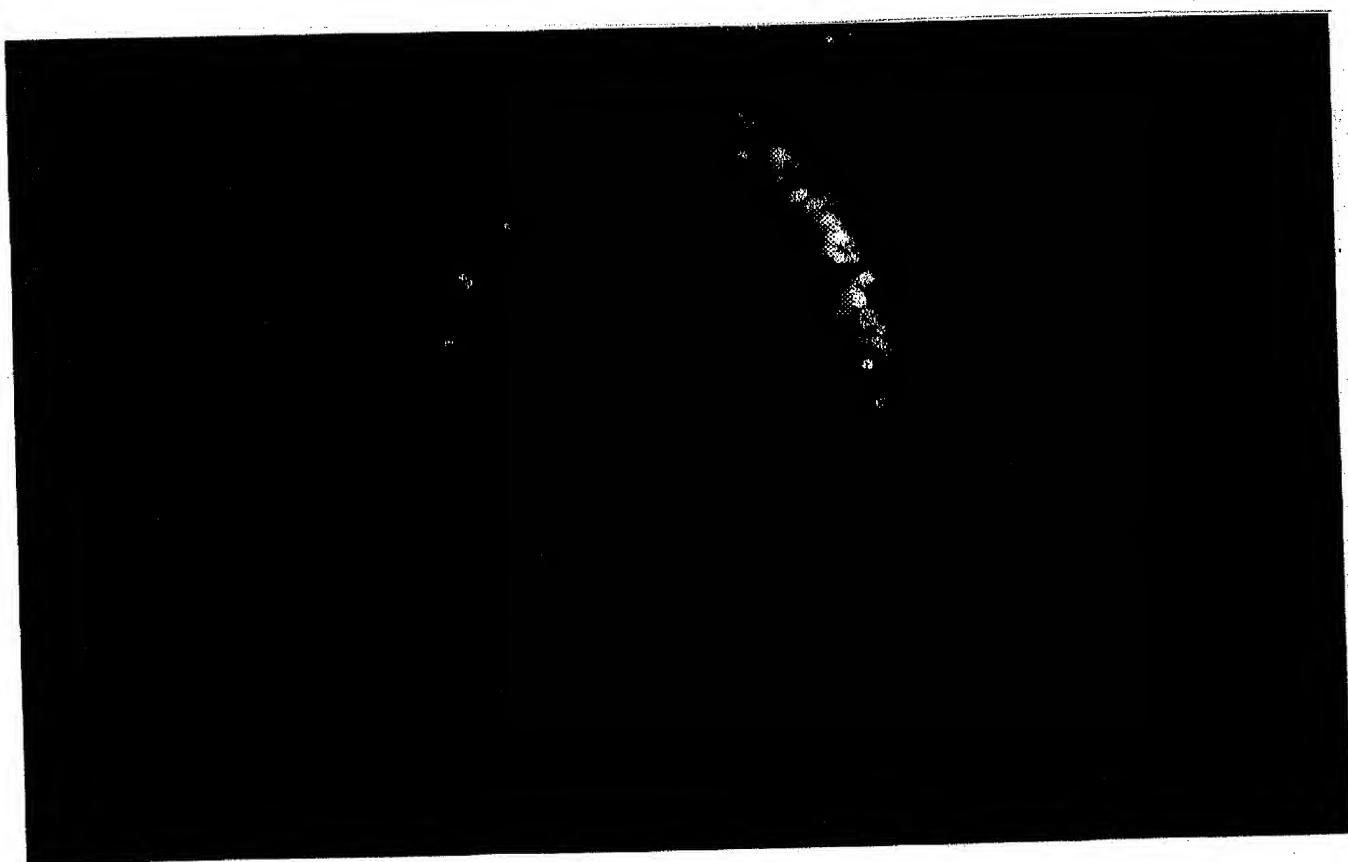


FIGURE 4A

9 / 28

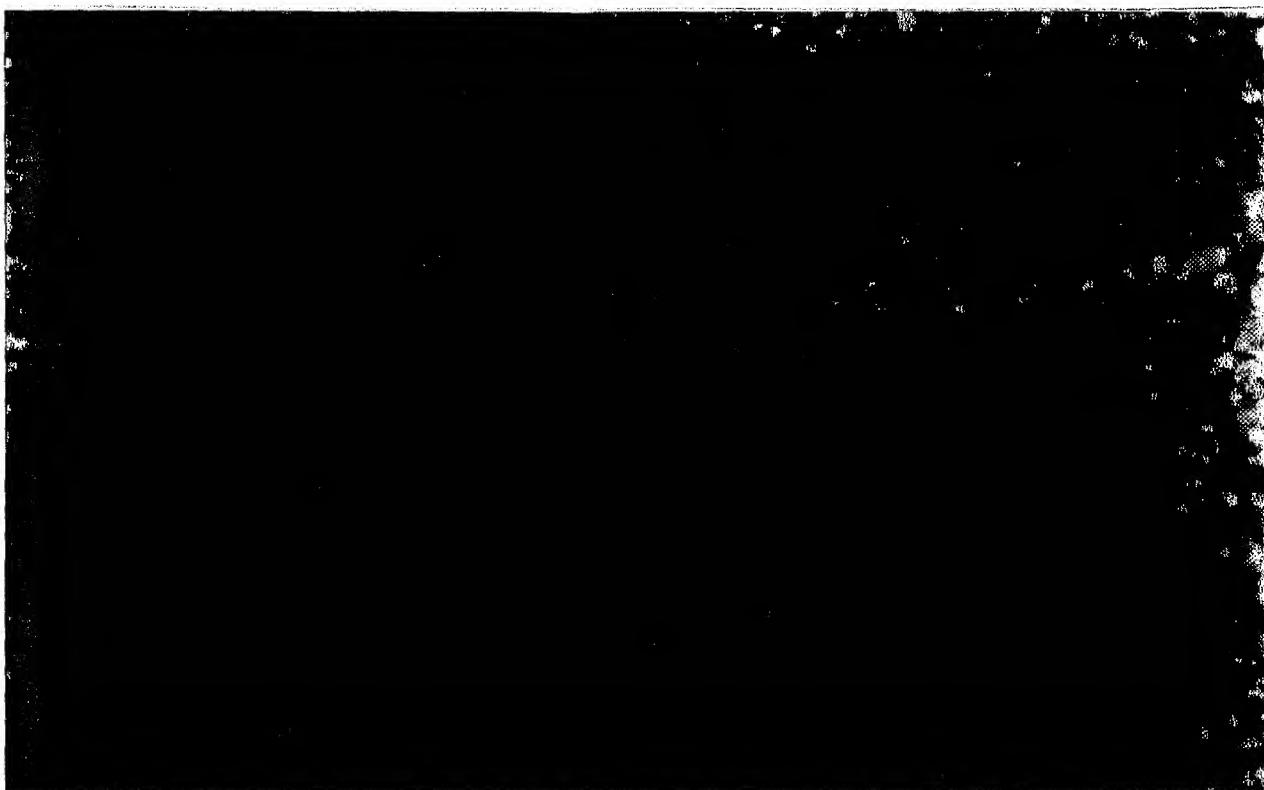


FIGURE 4B

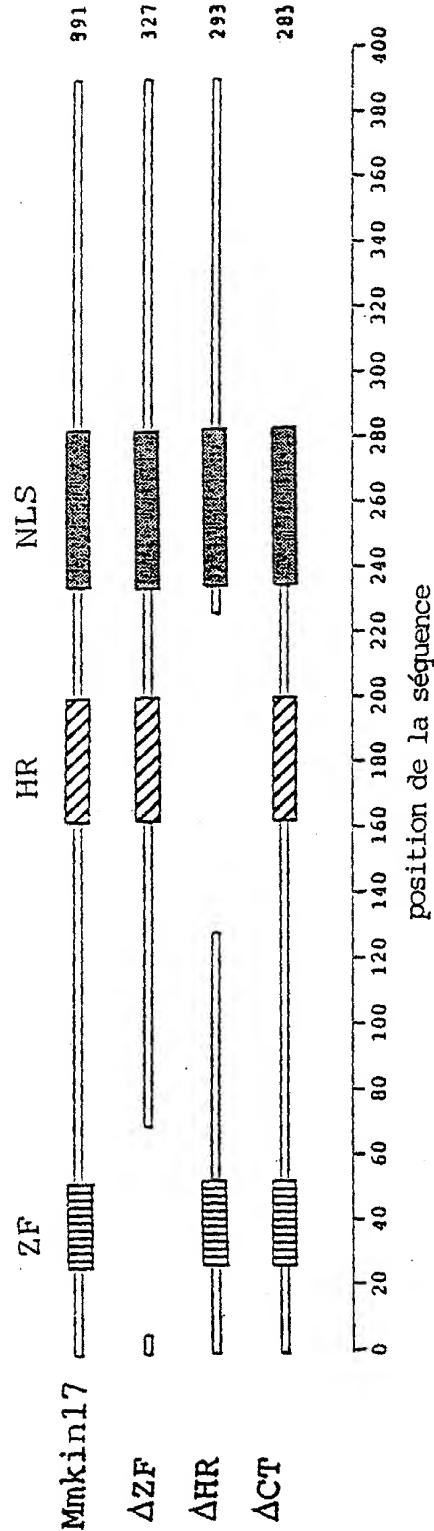


FIGURE 5

11 / 28

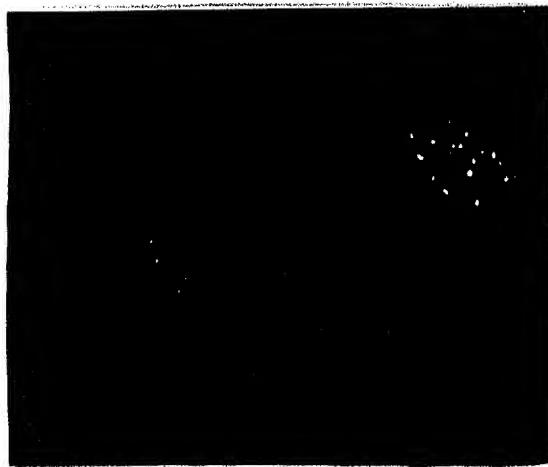


FIGURE 6A

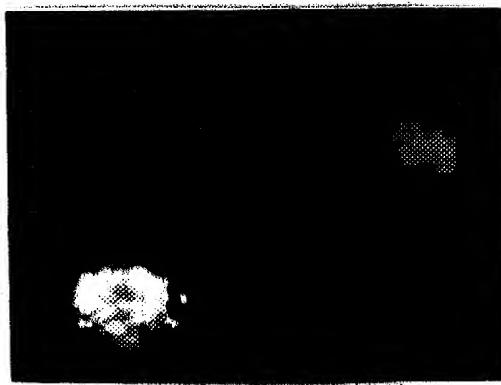
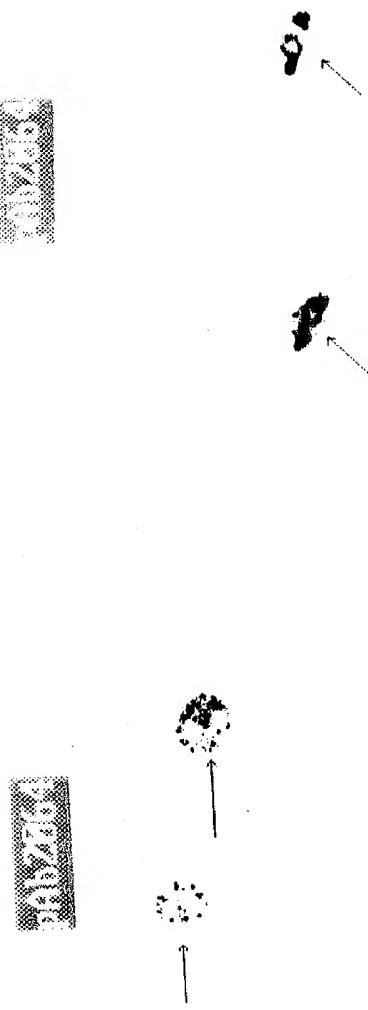


FIGURE 6B

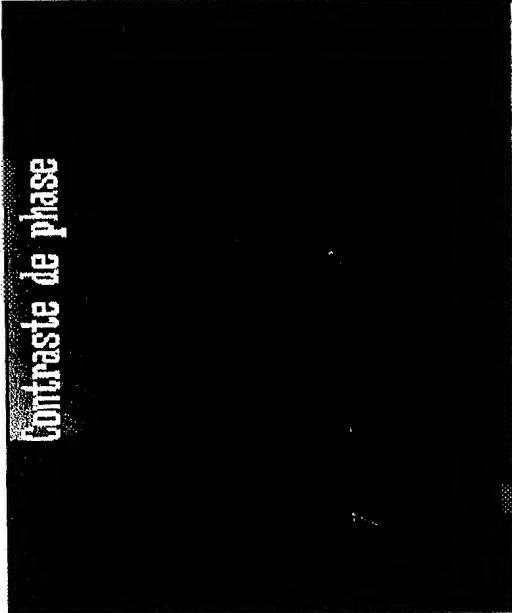
FIGURE 7A



•Contraste de phase



FIGURE 7B



pFabant i-RecA

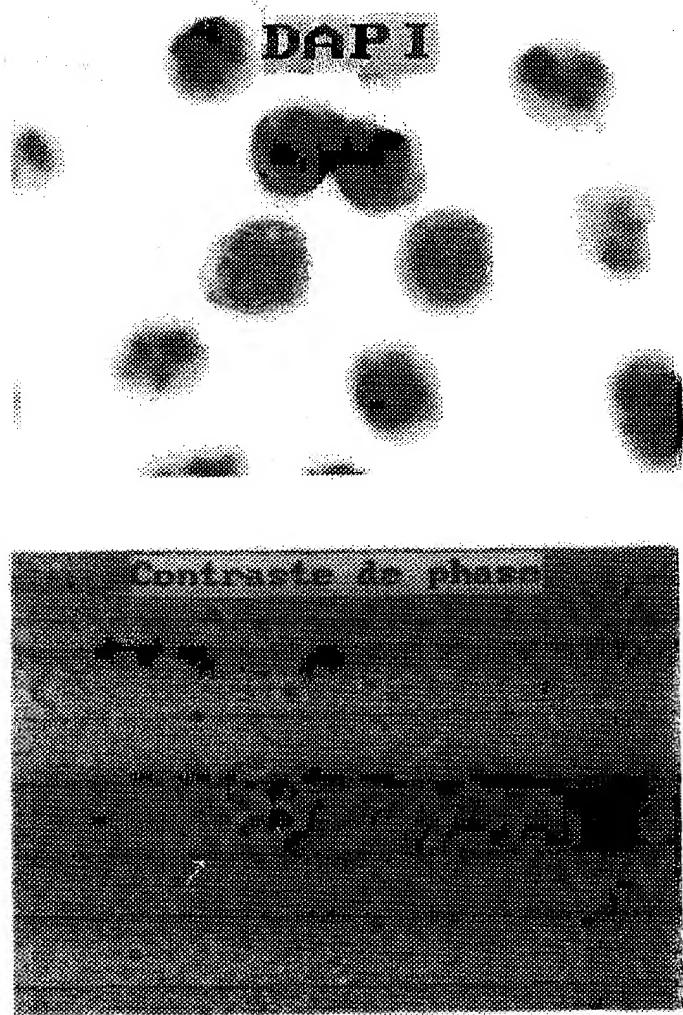


FIGURE 8A

14 / 28

pat2064



FIGURE 8B

15/28

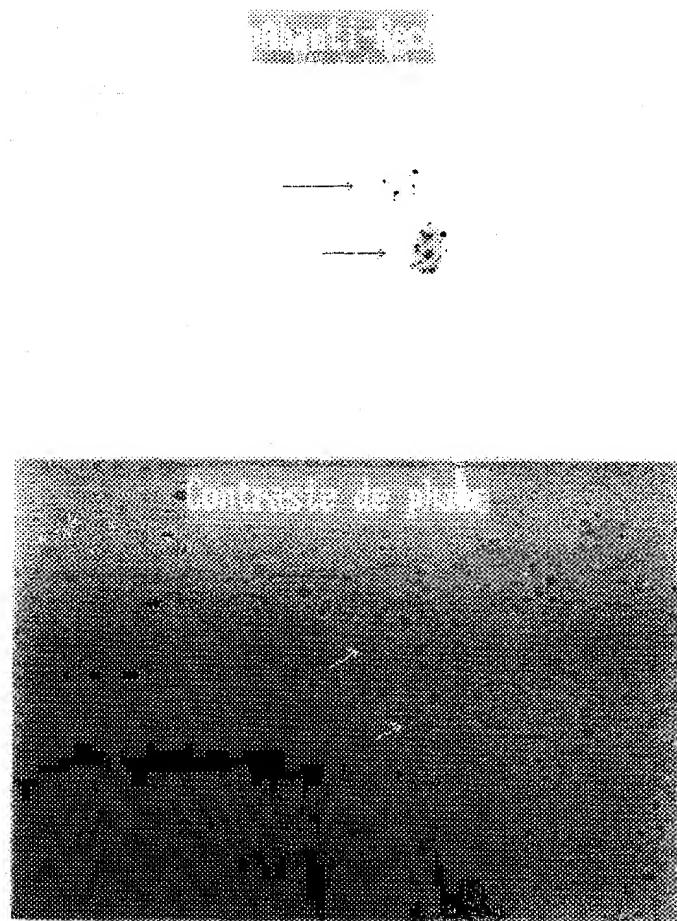


FIGURE 9

16/28

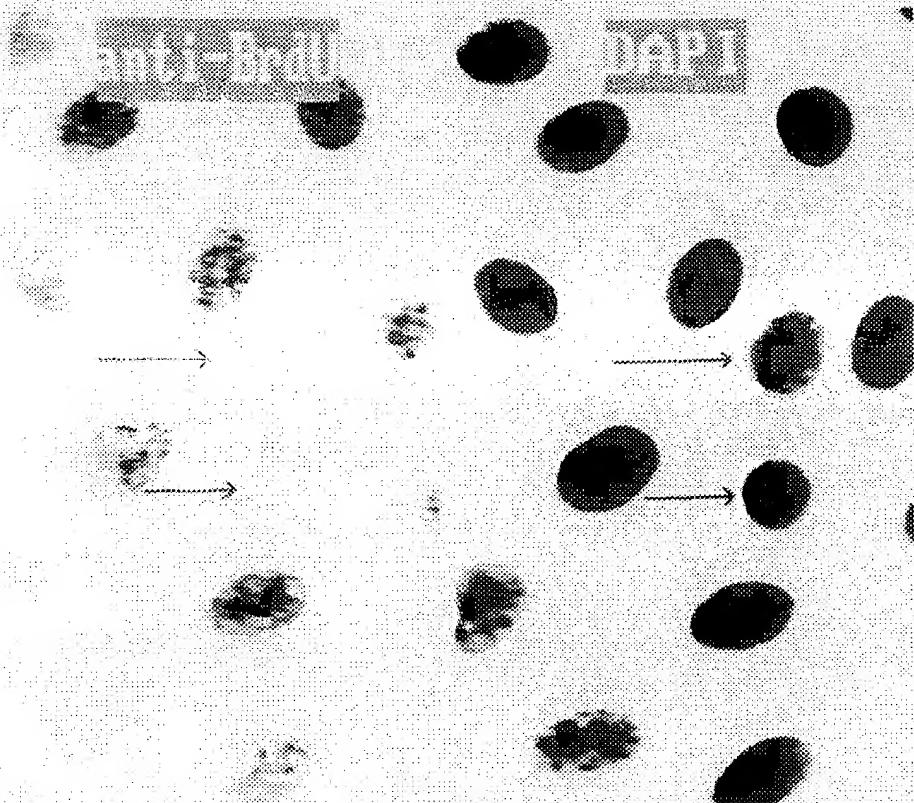
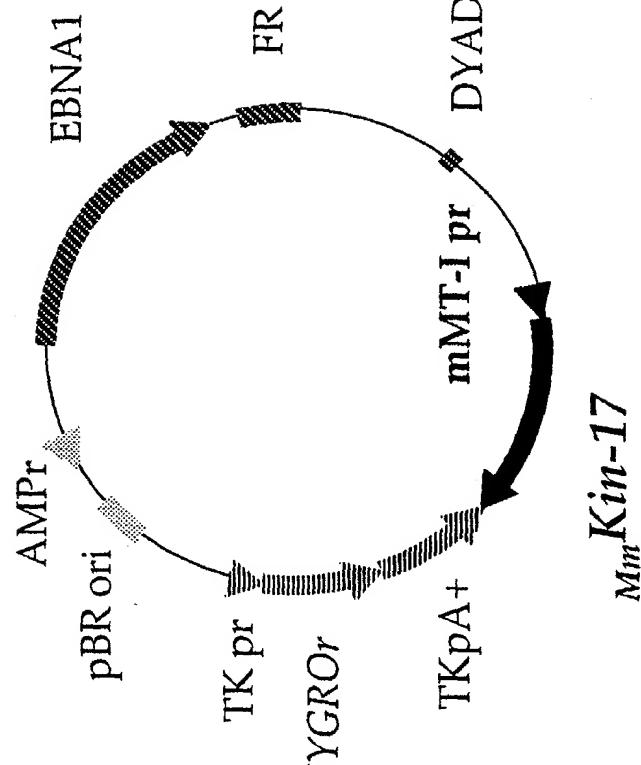


FIGURE 10A

17/28

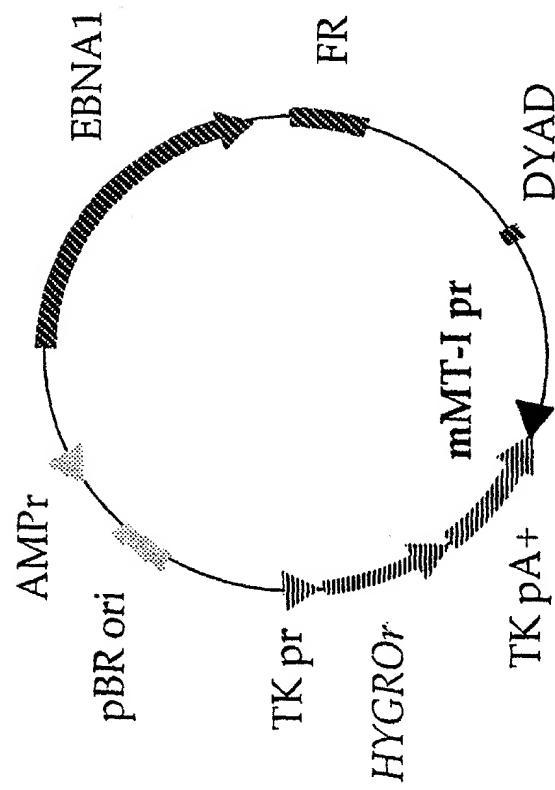
Protéine exprimée	néant	kin17	kinΔHR	kinΔCT
% de cellules réplicant leur ADN	40	40	0	33
	Faible taux	Fort taux		

FIGURE 10 B



pEBVMT_{Mm}Kin17 (pB223)
(10271 bp)

FIGURE 11B



pEBVMTΔ (pB220)
(8824 bp)

FIGURE 11A

19/28

FIGURE 12A



FIGURE 12B

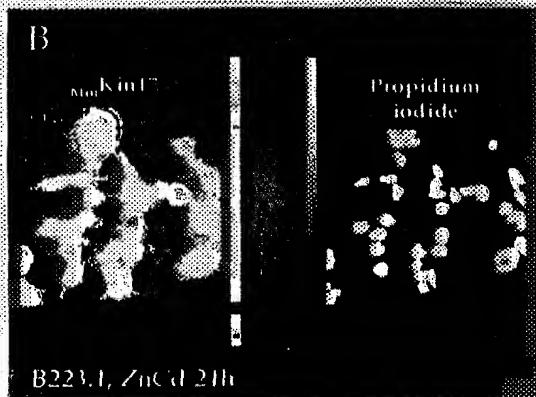


FIGURE 13C

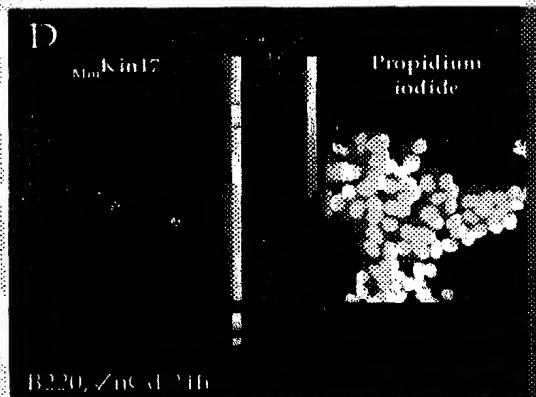
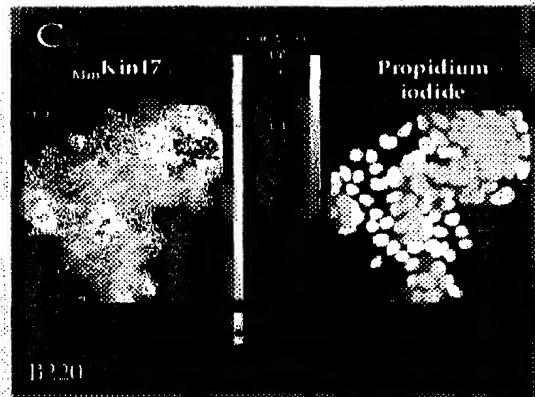


FIGURE 12D

20/28

A

E223.1

21(2)

FIGURE 13A

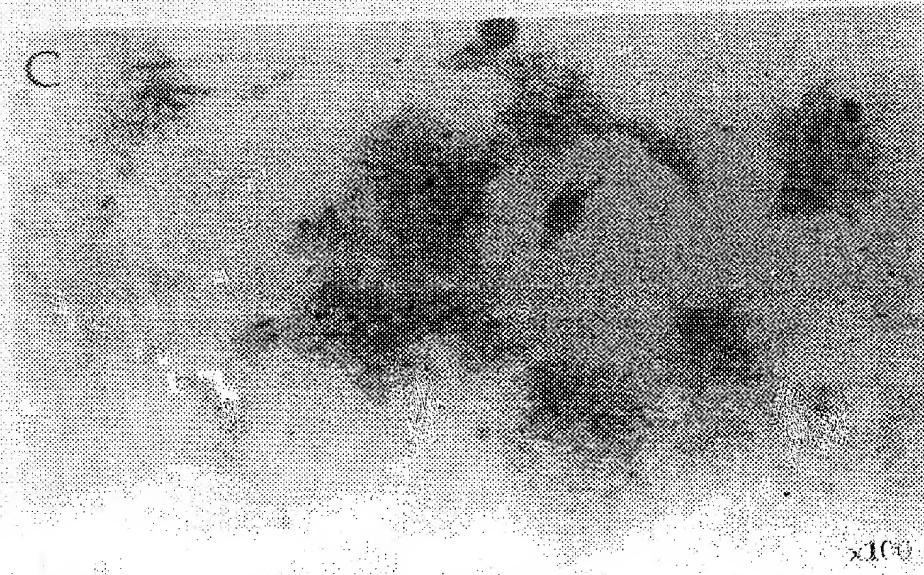
B

E223.1, ZnCd 24h

21(2)
x100

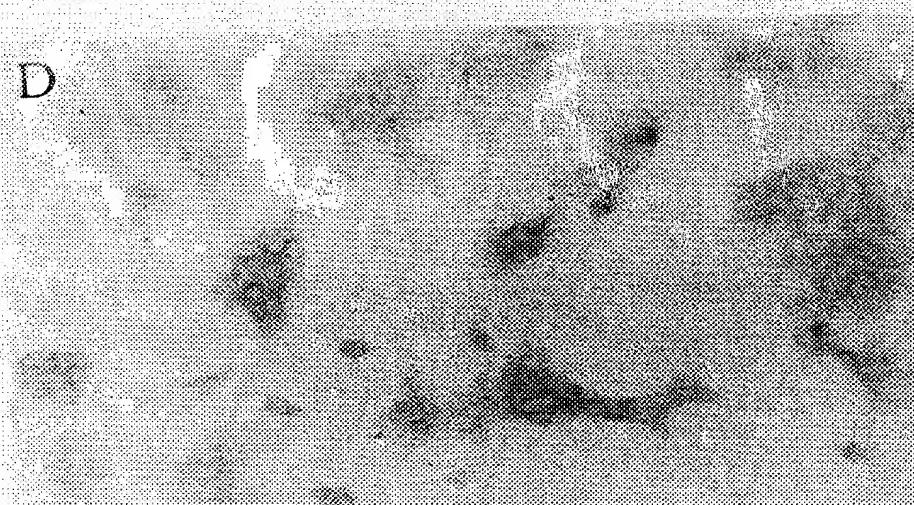
FIGURE 13B

21/33



$\times 100$

FIGURE 13C



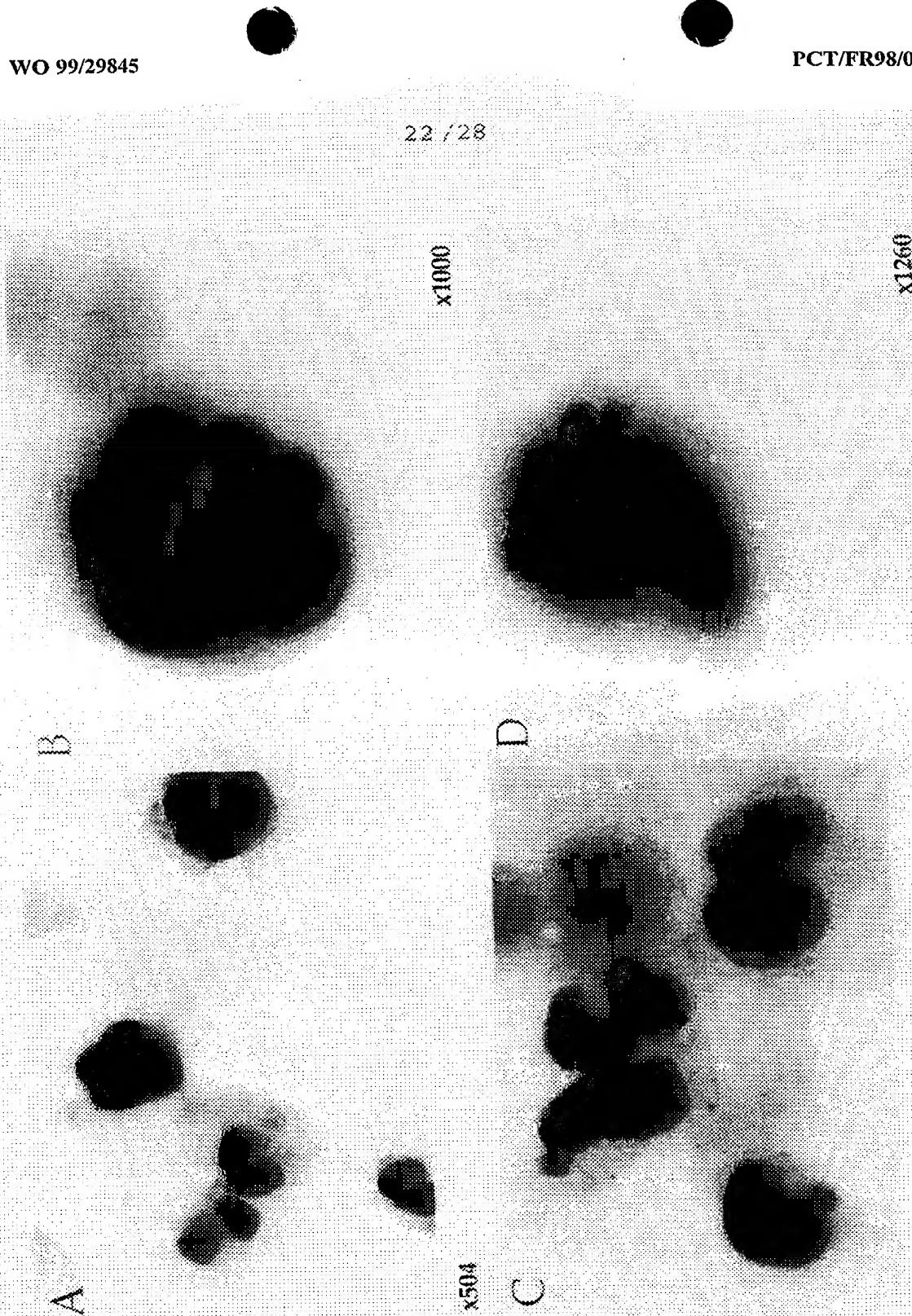
$\times 100$

8220, ZnCd 24h

FIGURE 13D

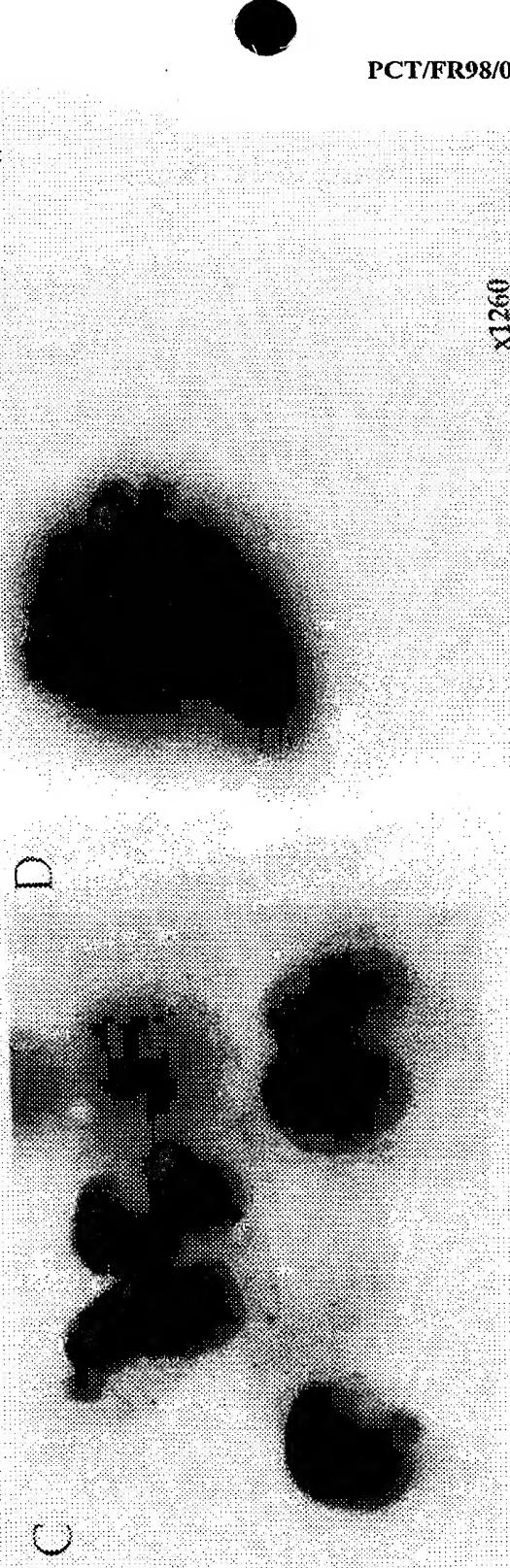
23 / 28

FIGURE 14B



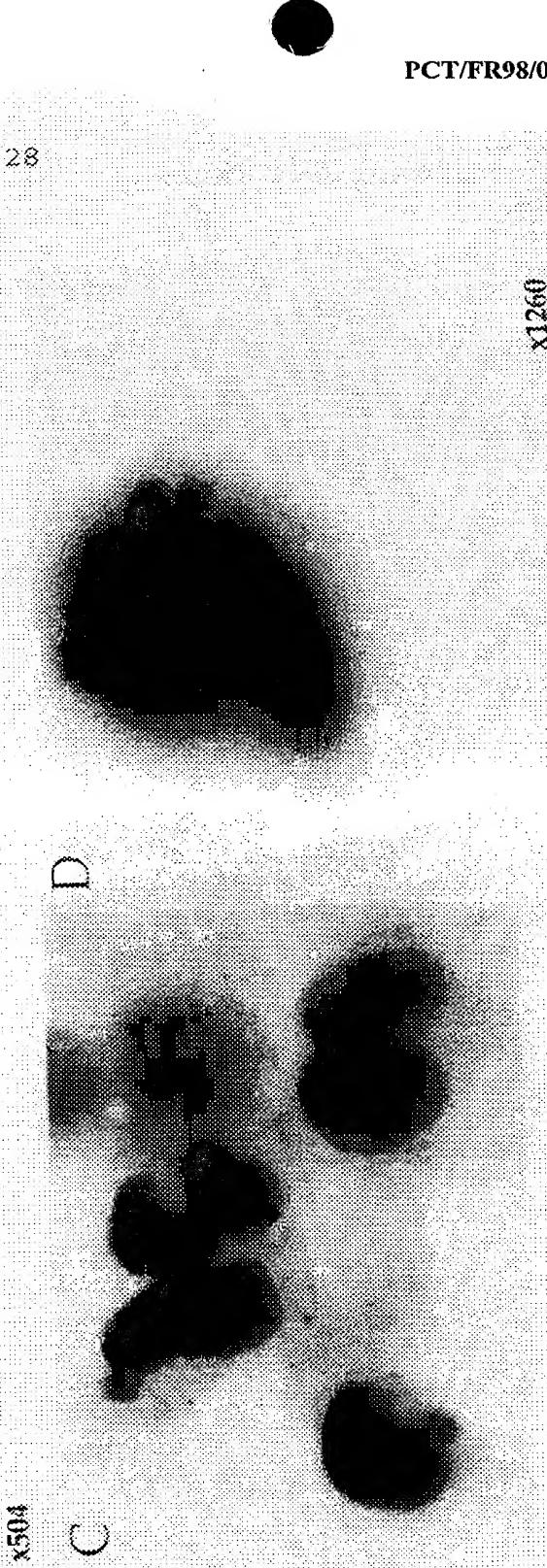
x1000

FIGURE 14D



x1260

FIGURE 14C



33/28

x1260

FIGURE 14F

FIGURE 14E

x2000

24 / 28

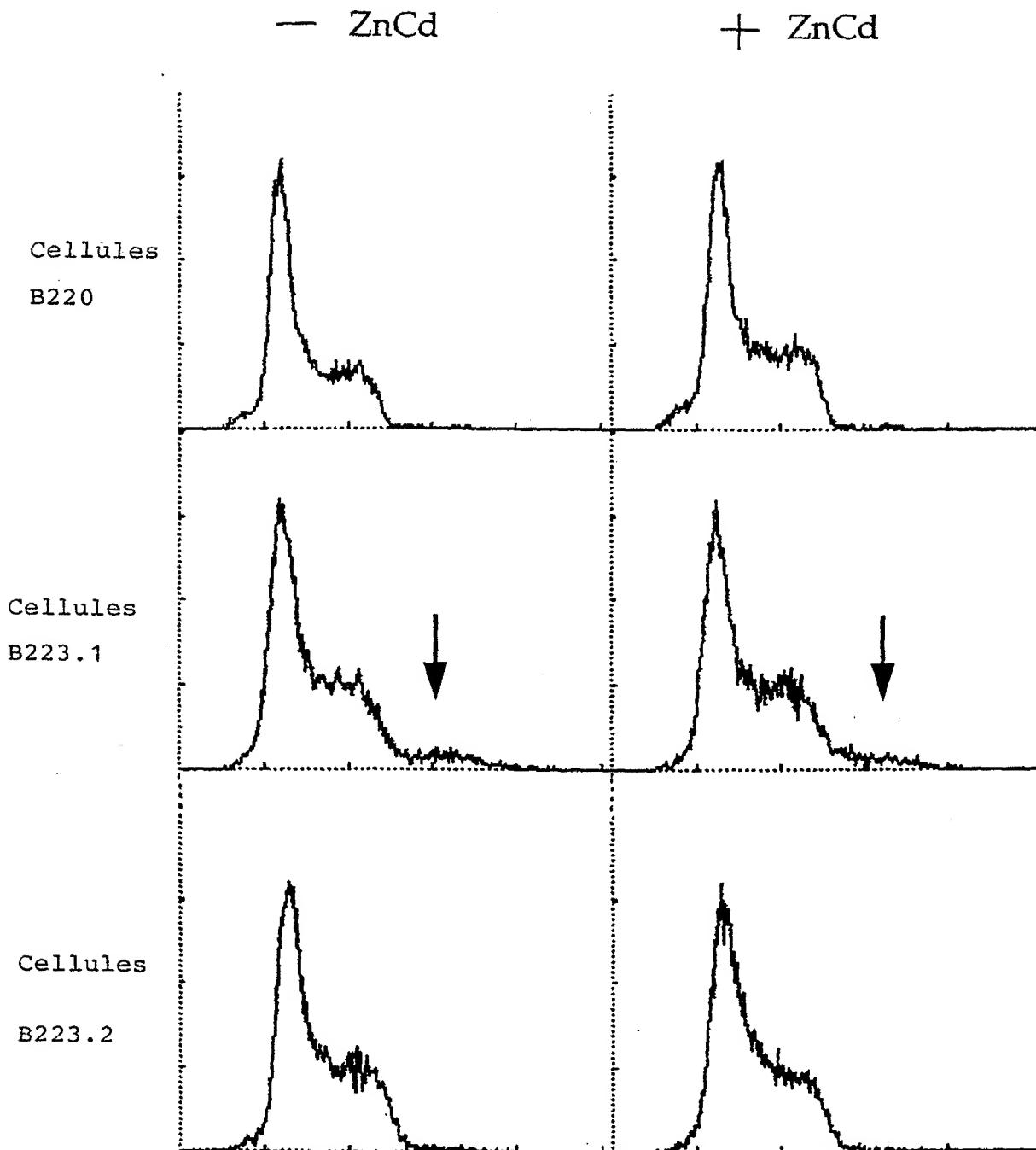
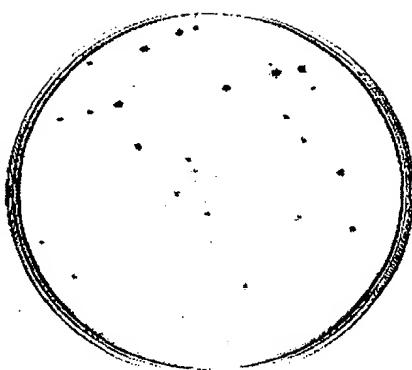
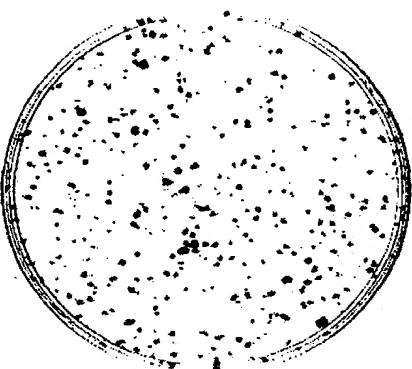
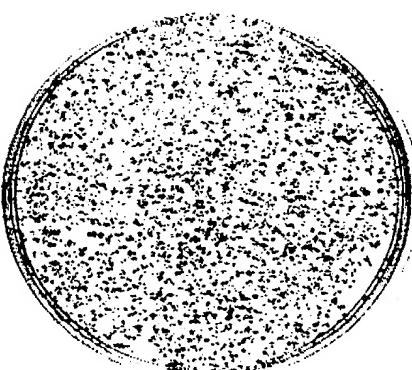
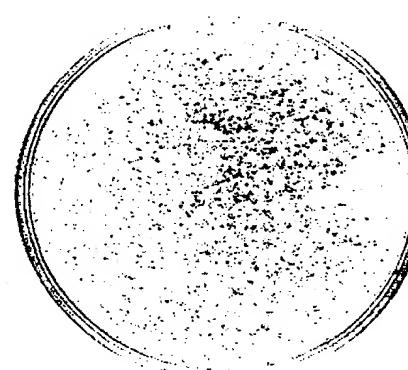
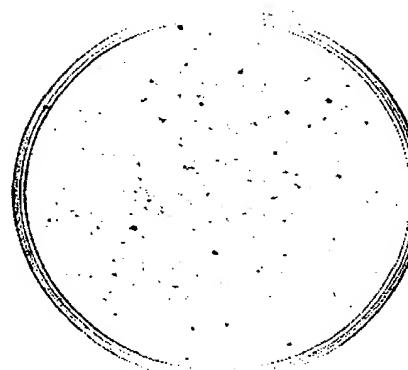
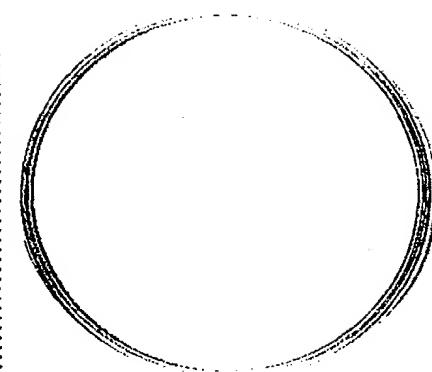


FIGURE 15

10^1 cellules/cm² 10^2 cellules/cm² 10^3 cellules/cm²

B220



B223.2

FIGURE 16

26 / 28

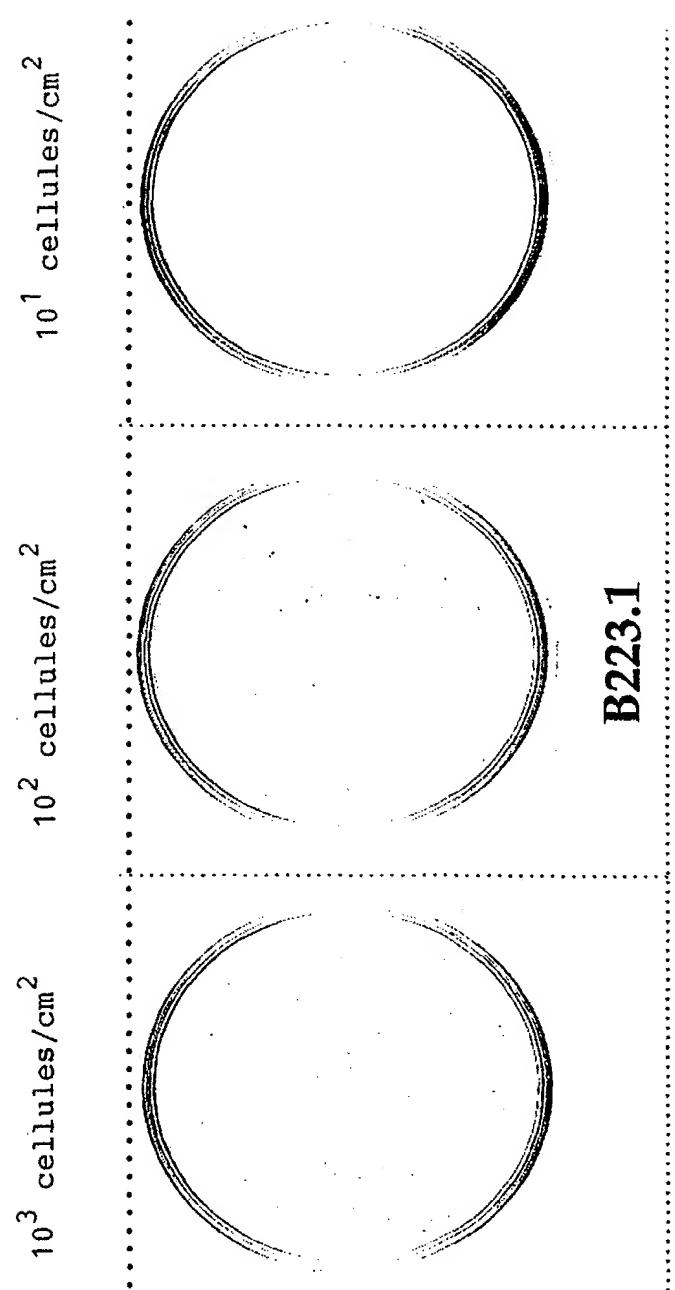


FIGURE 16 (suite)

FIGURE 17A

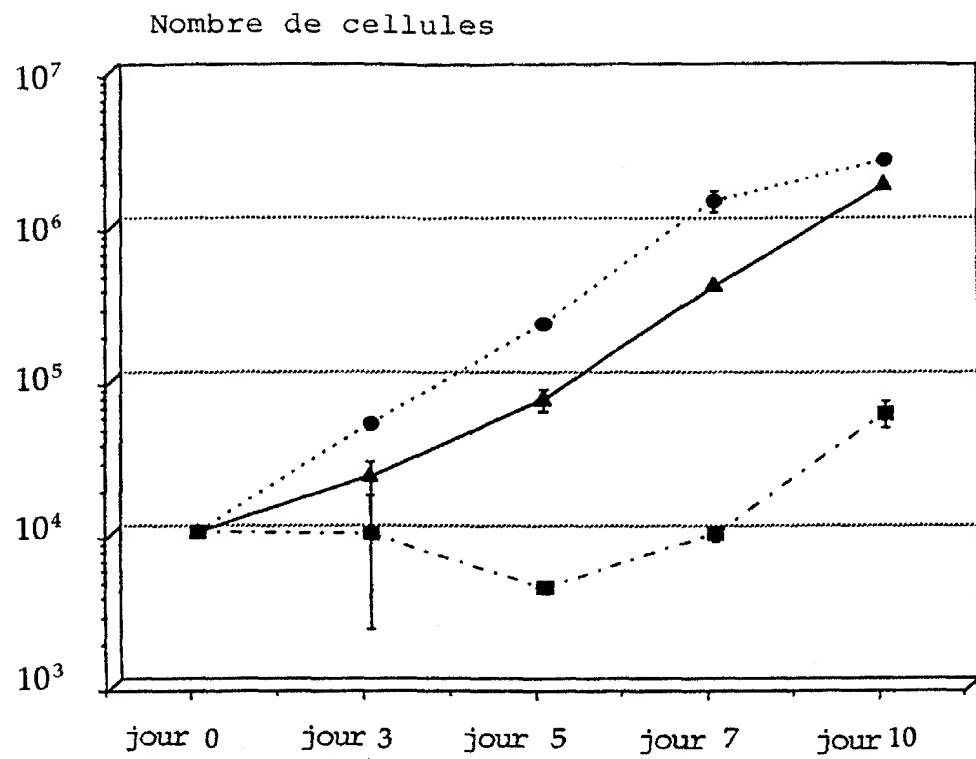
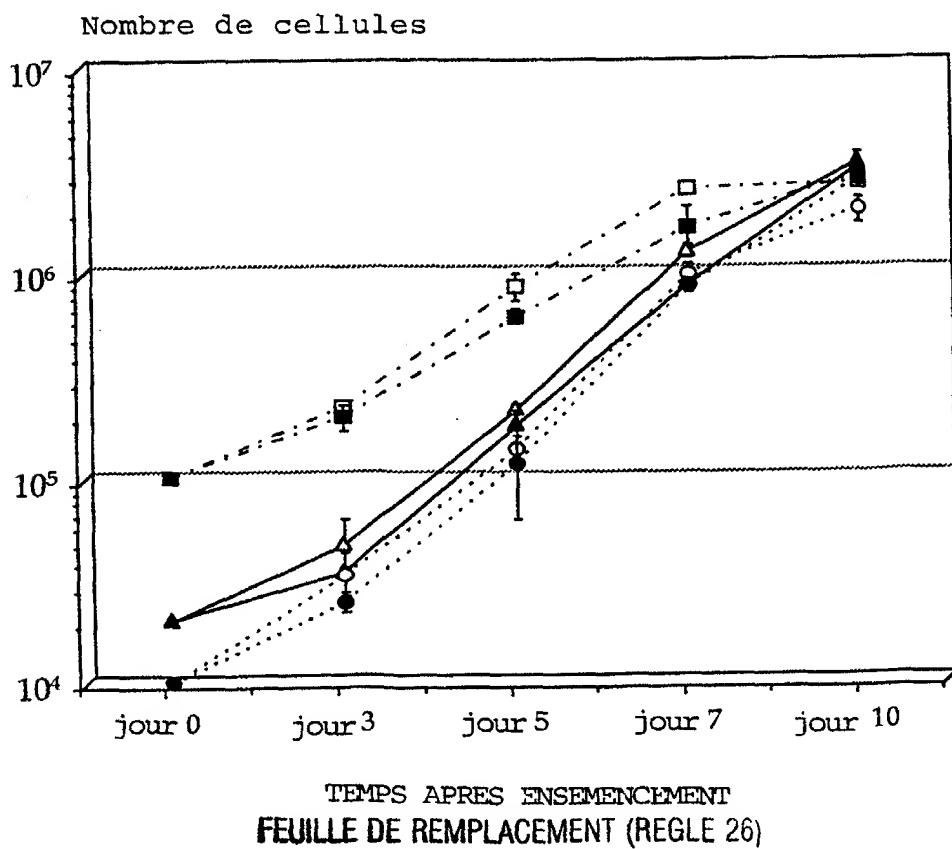
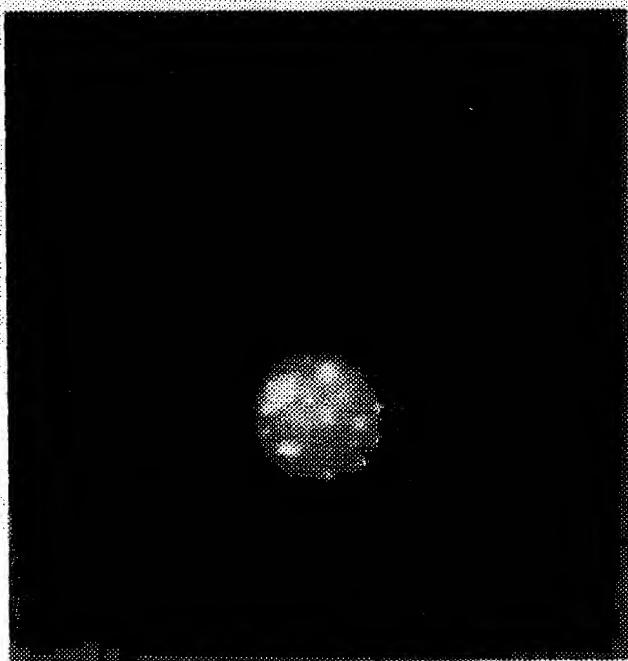


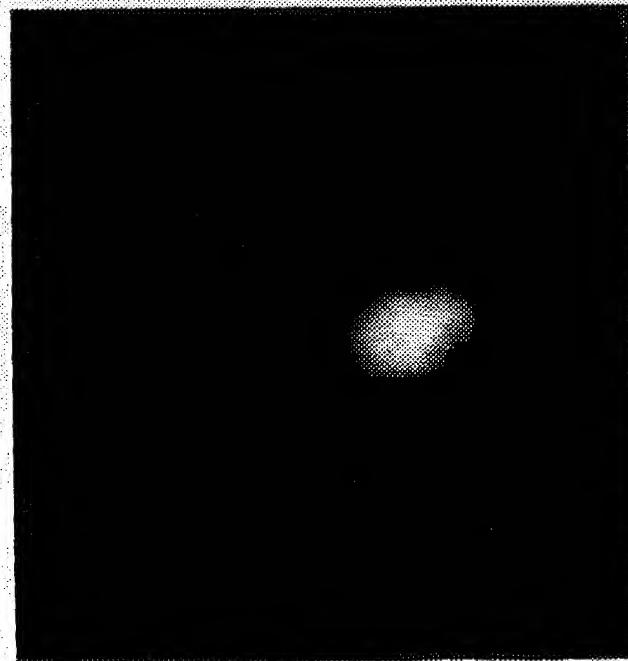
FIGURE 17B





GFPkin17SLN-CT

FIGURE 18B



GFPkin17DCT

FIGURE 18A

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> KANNOUCHE, Patricia
MAUFFREY, Philippe
PINON-LATAILLADE, Ghislaine
BIARD, Denis
ANGULO-MORA, Jaime Francisco
COMMISSARAIT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> SEQUENCES CODANT POUR UNE PROTEINE kin17 ET LEURS
APPLICATIONS

<130> BLOcp263/35P

<140>
<141>

<150> 97 15536

<151> 1997-12-09

<160> 36

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1
<211> 1528
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
ctagaattca gggcccgctg aattctagaa ctggggtcca gaaaagtgtac gctgcgtgg 60
tcgccccatggg gaagtcggat tttcttactc ccaaggctat cgccaaacagg atcaagtcca 120
aggggctgca gaagctacgc tggatttgcc agatgtgcc aagcagtgc cgggacgaga 180
atggctttaa gtgtcattgt atgtccgaat ctcatcagag acaactattg ctggcttcag 240
aaaatctca gcagtttagt gattattttt cagaggaatt ccgaaatgac tttctagaac 300
ttctcaggag acgctttggc actaaaaggg tccacaacaa cattgtctac aacgaataca 360
tcagccaccg agagcacatc cacatgaatg ccactcagtggaaactctg actgattttt 420
ctaagtggct gggcagagaa ggcttgca aagtggacga gacaccaaaa ggctggtata 480
ttcagttacat agacagggac ccagaaacta tccggccggca actggaaactg gagaaaaaaga 540
aaaagcagga ctttgatgtt gaagaaaaaa ctgccaaatttatttgaagag caagtggagaa 600
gaggcctgga agggaaaggaa caggagggtcc ctacttttac ggaattaagc agagaaaaatg 660
atgaagagaa agtcacgttt aattttgatgta aaggagcatg tagctcatcc ggagcaacat 720
cttccaaagtc aagtactctg ggaccgagtg cactgaagac gataggaagt tcagcatcag 780
tggaaacgaaa agaatcttcc cagagctcaa ctcagtctaa agaaaaagaag aaaaagaaat 840
ctgcactgga tggaaatcatg gagattgaag agggaaaagaa aagaactgccc cgaacagact 900
actggctaca gcctgaaaattt attgtggaaa ttataaccaa gaaactggga gagaataatc 960
ataagaaaaa ggcttattttt aaggaagttt ttgacaata tacagctgtt gtgaagatga 1020
ttgattctgg agacaagctg aaacttgacc agactcattt agagacagta attccagcac 1080
caggaaaaag aattcttagtt ttaaatggag gctacagagg aaatgaaggt acccttagaat 1140
ccatcaatga gaagactttt tcagctacta tcgtcattga aactggccct ttaaaaaggac 1200
gcagagttga aggaattcaa tatgaagaca ttctaaact tgccctgagtt tgaaaatttg 1260
ttaacaatac attaaaatct taaaagcatca aattgggttt cgccaaaggca ttatgagact 1320
ctactgtgtt agggatattt ctttgtata aaacaaacag gtttttgaaa atattactgt 1380
atagttgttc agctaaactt tgagaagaat ttaattatgt ctcatgaggt atcaaactat 1440
gtaattttgt ctttgttattt ttttgttcc ttgtatatttta cttgtatgtt ttatatcttc 1500

attnaagaat gttattataa aaaaaaaaa

1528

<210> 2
 <211> 1102
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 2

atggcaagt cggattttctt gagcccaag gccatcgcca atagaattaa gtccaaaggg 60
 ctccagaagc ttcgctggta ctgccagatg tgccaaaagc aatgccgcga cgagaatggc 120
 tttaaatgtc actgtatgtc tgaatctcat caaagacaac tggtgctggc ttcagaaaaac 180
 cctcagcagt ttatggatta ttttcagag gaattccgaa atgacttctt ggaacttctg 240
 aggccgacgt ttggcactaa aagggtccac aacaacattt tctacaatga atacatcagc 300
 caccgagagc acatccacat gaacgttacc cagtgggaga cactgaccga cttaaccaag 360
 tggctgggca gagagggctt gtgtaaagggtt accagtgcac tgaagctgct ggggagcgc 420
 gcatccggga aacggaaaaga gtcttcacag agctccgcgc agcctgcgaa gaagaagaag 480
 tcggccctgg atgagatcat ggagctcgaa gaggaaaaga aaaggaccgc acggacagac 540
 gcctgggtac agccggggat cgttggaaa attataacga agaagcttgg ggagaaatat 600
 cacaagaaga aagggggtcgta taaggaagtg attgacaggtt acacagctgtt ggtaaagatg 660
 actgactctg gagacaggctt gaaactggac cagactcatt tagagacagt cattccggcc 720
 ccggggaaaaa gggttcttagt tttaatggta ggctacagag gaaatgaagg cacttctcgaa 780
 tccatcaatg agaaggctt ttcagccacg atagtcattt aaactggacc tttgaaagga 840
 cgcagagtgtt aagggtattca atatgaagac atatctaaac ttgcttgagt ttgaaaattt 900
 gataacaaca cattgaaact gtgaagcattc aaattgggtgt tagccaaggc actgtgttaac 960
 tctactgtgt taggggattt gttttgtatt aaaaaaaaaaa aaatcatcta tttaataact 1020
 agtgaatagt tggtaaattt tataataaaaa tctatgtttt tttaagtgtt aaaaaaaaaaa 1080
 aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aa 1102

<210> 3
 <211> 1002
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

tgattcgagc tcggtacccg gggatccgat tagaaagtga tcgctgccgt ggtcgcccattt 60
 gggaaatcgatggg attttcttac tcccaaggctt atcgccaaaca ggatcaagtc caaggggctt 120
 cagaagctac gctggatttgc ccagatgtgc cagaagcagt ggcgggacga gaatggcttt 180
 aagtgtcatt gtatgtccga atctcatcag agacaactat tgctggcttc agaaaaatctt 240
 cagcagtttta tggatttattt ttccagaggaa ttccgaaaatg actttcttaga acttctcagg 300
 agacgcatttgc gcaactaaag ggtccacaac aacattgtct acaacgaata catcagccac 360
 cgagagcaca tccacatgaa tgccactcag tggggaaactc tgactgattt tactaagtgg 420
 ctggcagag aaggcttgc caaaagtgc a tgaagacga taggaagttt agcatcagtgc 480
 aaacgaaaag aatcttccca gagctcaact cagtctaaag aaaagaagaa aaagaaatct 540
 gcactggatg aaatcatgaa gattgaagag gaaaagaaaaa gaactgcccgc aacagactac 600
 tggctacagc ctgaaaattt ttttttttttataaccaaga aactgggaga gaaatatcat 660
 aagaaaaagg ctattgtttaa ggaagtaattt gacaaatataa cagctgttgc gaagatgattt 720
 gattctggag acaagctgaa acttgaccag actctttagt agacagtaat tccagccacca 780
 gggaaaaagaa ttcttagttt aaatggggc tacagaggaa atgaaggtac cctagaatcc 840
 atcaatgaga agacttttc agctactatc gtcattgaaa ctggccctttt aaaaggacgc 900
 agagttgaag gaattcaata tgaagacatt tctaaacttgc cctgagtttgc aaaaattttttt 960
 aacaataacctt tttaatctt aaagcatcaa attgggttgc gc 1002

<210> 4
<211> 1002
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4
tcagagacaa ctattgctgg cttagaaaa tcctcagcag tttatggatt atttttcaga 60
ggaattccga aatgactttc tagaacttct caggagacgc tttggcacta aaagggtcca 120
caacaacatt gtctacaacg aatacatcg ccaccgagag cacatccaca tgaatgccac 180
tcagtgaaactctgactg atttactaa gtggctgggc agagaaggct tgtgcaaagt 240
ggacgagaca ccaaaaggct ggtatattca gtacatagac agggacccag aaactatccg 300
ccggcaactg gaactggaga aaaagaaaaa gcaggaccctt gatgatgaag aaaaaactgc 360
caaattatt gaagagcaag tgagaagagg ccttggaaagg aaggaacagg aggtccctac 420
ttttacggaa ttaagcagag aaaatgtga agagaaaatgc acgtttaatt tgagtaaagg 480
agcatgtgc tcatccggag caacatcttc caagtcaagt actctggac cgagtgcact 540
gaagacgata ggaagttcag catcgtgaa acgaaaagaa tcttcccaga gctcaactca 600
gtctaaagaa aagaagaaaa agaaatctgc actggatgaa atcatggaga ttgaagagga 660
aaagaaaaaga actgccccgaa cagactactg gctacaggct gaaattattg tgaaaattat 720
aaccaagaaa ctgggagaga aatatcataa gaaaaaggct attgttaagg aagtaattga 780
caaataataca gctgttgtga agatgattga ttctggagac aagctgaaac ttgaccagac 840
tcatttagag acagtaattc cagcaccagg aaaaagaatt ctatgtttaa atggaggcgt 900
cagagaaat gaaggtaccc tagaatccat caatgagaag acttttcag ctactatcgt 960
cattgaaact ggccctttaa aaggacgcag agttgaagga at 1002

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
ctcaggagac gctttggcac ta 22

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
cctggtgctg gaattactgt ct 22

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
tctttcggt tcactgatgc t 21

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
gggagagaaa tatcataaga aaaa 24

<210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9
tccctctgta gccctccat tt 22

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
ttttcagcta ctatcggtca tt 22

<210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11
cgagtgcact gaagacgata gg 22

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12
attctttcg tttcactgat 20

<210> 13
<211> 26
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 13
ggcaataccca gcgttagcttc tgcagc 26

<210> 14
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14
ctctgatgag attcggacat acaat 25

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15	
tctcctgaga agttctagaa a	21
<210> 16	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
actgc当地at ttattgaaga gcaagtgaga agaggcctgg	40
<210> 17	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 17	
ccaggcctct tctcaacttgc tcttc当地ataa atttggcagt	40
<210> 18	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
agaaaagtgat cgctgccgtg gt	22
<210> 19	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
gcgaacacca atttgatgct ttaaga	26
<210> 20	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
tcagagacaa ctattgctgg c	21
<210> 21	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
atcccttcaa ctctgcgtcc tt	22
<210> 22	
<211> 291	
<212> PRT	
<213> Mus sp.	

<400> 22
Met Gly Lys Ser Asp Phe Leu Ser Pro Lys Ala Ile Ala Asn Arg Ile
1 5 10 15
Lys Ser Lys Gly Leu Gln Lys Leu Arg Trp Tyr Cys Gln Met Cys Gln
20 25 30
Lys Gln Cys Arg Asp Glu Asn Gly Phe Lys Cys His Cys Met Ser Glu
35 40 45
Ser His Gln Arg Gln Leu Leu Leu Ala Ser Glu Asn Pro Gln Gln Phe
50 55 60
Met Asp Tyr Phe Ser Glu Glu Phe Arg Asn Asp Phe Leu Glu Leu Leu
65 70 75 80
Arg Arg Arg Phe Gly Thr Lys Arg Val His Asn Asn Ile Val Tyr Asn
85 90 95
Glu Tyr Ile Ser His Arg Glu His Ile His Met Asn Ala Thr Gln Trp
100 105 110
Glu Thr Leu Thr Asp Phe Thr Lys Trp Leu Gly Arg Glu Gly Leu Cys
115 120 125
Ala Leu Lys Leu Leu Gly Ser Ala Ala Ser Gly Lys Arg Lys Glu Ser
130 135 140
Ser Gln Ser Ser Ala Gln Pro Ala Lys Lys Lys Ser Ala Leu Asp
145 150 155 160
Glu Ile Met Glu Leu Glu Glu Lys Lys Arg Thr Ala Arg Thr Asp
165 170 175
Ala Trp Leu Gln Pro Gly Ile Val Val Lys Ile Ile Thr Lys Lys Leu
180 185 190
Gly Glu Lys Tyr His Lys Lys Lys Gly Val Val Lys Glu Val Ile Asp
195 200 205
Arg Tyr Thr Ala Val Val Lys Met Thr Asp Ser Gly Asp Arg Leu Lys
210 215 220
Leu Asp Gln Thr His Leu Glu Thr Val Ile Pro Ala Pro Gly Lys Arg
225 230 235 240
Val Leu Val Leu Asn Gly Gly Tyr Arg Gly Asn Glu Gly Thr Leu Glu
245 250 255
Ser Ile Asn Glu Lys Ala Phe Ser Ala Thr Ile Val Ile Glu Thr Gly
260 265 270
Pro Leu Lys Gly Arg Arg Val Glu Gly Ile Gln Tyr Glu Asp Ile Ser
275 280 285

Lys Leu Ala
290

<210> 23
<211> 293
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Gly Lys Ser Asp Phe Leu Thr Pro Lys Ala Ile Ala Asn Arg Ile
1 5 10 15

Lys Ser Lys Gly Leu Gln Lys Leu Arg Trp Tyr Cys Gln Met Cys Gln
20 25 30

Lys Gln Cys Arg Asp Glu Asn Gly Phe Lys Cys His Cys Met Ser Glu
35 40 45

Ser His Gln Arg Gln Leu Leu Ala Ser Glu Asn Pro Gln Gln Phe
50 55 60

Met Asp Tyr Phe Ser Glu Glu Phe Arg Asn Asp Phe Leu Glu Leu Leu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Phe Gly Thr Lys Arg Val His Asn Asn Ile Val Tyr Asn
85 90 95

Glu Tyr Ile Ser His Arg Glu His Ile His Met Asn Ala Thr Gln Trp
100 105 110

Glu Thr Leu Thr Asp Phe Thr Lys Trp Leu Gly Arg Glu Gly Leu Cys
115 120 125

Ala Leu Lys Thr Ile Gly Ser Ser Ala Ser Val Lys Arg Lys Glu Ser
130 135 140

Ser Gln Ser Ser Thr Gln Ser Lys Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ala
145 150 155 160

Leu Asp Glu Ile Met Glu Ile Glu Glu Lys Lys Arg Thr Ala Arg
165 170 175

Thr Asp Tyr Trp Leu Gln Pro Glu Ile Ile Val Lys Ile Ile Thr Lys
180 185 190

Lys Leu Gly Glu Lys Tyr His Lys Lys Lys Ala Ile Val Lys Glu Val
195 200 205

Ile Asp Lys Tyr Thr Ala Val Val Lys Met Ile Asp Ser Gly Asp Lys
210 215 220

Leu Lys Leu Asp Gln Thr His Leu Glu Thr Val Ile Pro Ala Pro Gly
225 230 235 240

Lys Arg Ile Leu Val Leu Asn Gly Gly Tyr Arg Gly Asn Glu Gly Thr
 245 250 255

Leu Glu Ser Ile Asn Glu Lys Thr Phe Ser Ala Thr Ile Val Ile Glu
 260 265 270

Thr Gly Pro Leu Lys Gly Arg Arg Val Glu Gly Ile Gln Tyr Glu Asp
 275 280 285

Ile Ser Lys Leu Ala
 290

<210> 24

<211> 1390

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 24

atggccaagt cggattttct gagccccaaag gccatcgcca atagaattaa gtccaaaggg 60
 ctccagaagc ttcgctggta ctgcacatgc tgccaaaagc aatgcgcga cgagaatggc 120
 tttaagtgtc actgtatgtc tgaatctcat caaagacaac tggctggc ttcagaaaac 180
 cctcagcagt ttatggatta ttttcagag gaattccgaa atgactttct ggaacttctg 240
 aggccacgct ttggcactaa aagggtccac aacaacattg tctacaatga atacatcagc 300
 caccgagagc acatccacat gaacgcttacc cagtggaga cactgaccga cttaaccaag 360
 tggctggca gagaggcgtt gtgtaaaatgt gatgagacac cgaaaggctg gtacattcag 420
 tacatagaca gagaccaga aaccatccgt cggcaactgg aattagaaaa aaagaagaag 480
 caagatctgg acgatgaaga aaaaactgcc aagttcattt aggagcagggt gagaagagc 540
 ctggaaaggaa aagagcagga gacacctgtt tttacagaac ttagccgaga aaatgaggaa 600
 gaaaaagtta cgttcaatct gaataaaagga gcccgtggct cagcgggagc tacaacatcc 660
 aagtcaagct ctttgggacc aagtgcactg aagctgtgg ggagcgcagc atccggaaaa 720
 cggaaagagt cttcacagag ctccgcccag cctgcgaaga agaagaagtc ggcctggat 780
 gagatcatgg agctcgaaga ggaaaaagaaa aggaccgcac ggacagacgc ctggttacag 840
 ccggggatcg ttgtgaaaat tataacgaag aagcttgggg agaaatatca caagaagaaa 900
 ggggtogtta aggaagtgtat tgacaggtac acagctgtgg taaagatgac tgactctgga 960
 gacaggctga aactggacca gactcattt gagacagtca ttccggcccc gggaaaaagg 1020
 gttctagttt taaaatggagg ctacagagga aatgaaggca ctctcgaatc catcaatgag 1080
 aaggctttt cagccacgt agtcatttgc actggacatt tgaaaggacg cagagttgaa 1140
 ggtattcaat atgaagacat atctaaactt gcttggatgg taaaatgttga taacaacaca 1200
 ttgaaactgt gaagcatcaa attgggttta gccaaggccac tggtaactc tactgtgttta 1260
 ggggattttgt ttgttattaa aaaaaaaaaa atcatctatt taaataactag tgaatagttg 1320
 gttaaattta taataaaatc tatgttttt ttaagtgtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380
 aaaaaaaaaa 1390

<210> 25

<211> 391

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 25

Met Gly Lys Ser Asp Phe Leu Ser Pro Lys Ala Ile Ala Asn Arg Ile
 1 5 10 15

Lys Ser Lys Gly Leu Gln Lys Leu Arg Trp Tyr Cys Gln Met Cys Gln
20 25 30

Lys Gln Cys Arg Asp Glu Asn Gly Phe Lys Cys His Cys Met Ser Glu
35 40 45

Ser His Gln Arg Gln Leu Leu Leu Ala Ser Glu Asn Pro Gln Gln Phe
50 55 60

Met Asp Tyr Phe Ser Glu Glu Phe Arg Asn Asp Phe Leu Glu Leu Leu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Phe Gly Thr Lys Arg Val His Asn Asn Ile Val Tyr Asn
85 90 95

Glu Tyr Ile Ser His Arg Glu His Ile His Met Asn Ala Thr Gln Trp
100 105 110

Glu Thr Leu Thr Asp Phe Thr Lys Trp Leu Gly Arg Glu Gly Leu Cys
115 120 125

Lys Val Asp Glu Thr Pro Lys Gly Trp Tyr Ile Gln Tyr Ile Asp Arg
130 135 140

Asp Pro Glu Thr Ile Arg Arg Gln Leu Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys
145 150 155 160

Gln Asp Leu Asp Asp Glu Glu Lys Thr Ala Lys Phe Ile Glu Glu Gln
165 170 175

Val Arg Arg Gly Leu Glu Gly Lys Glu Gln Glu Thr Pro Val Phe Thr
180 185 190

Glu Leu Ser Arg Glu Asn Glu Glu Lys Val Thr Phe Asn Leu Asn
195 200 205

Lys Gly Ala Gly Gly Ser Ala Gly Ala Thr Thr Ser Lys Ser Ser Ser
210 215 220

Leu Gly Pro Ser Ala Leu Lys Leu Leu Gly Ser Ala Ala Ser Gly Lys
225 230 235 240

Arg Lys Glu Ser Ser Gln Ser Ser Ala Gln Pro Ala Lys Lys Lys Lys
245 250 255

Ser Ala Leu Asp Glu Ile Met Glu Leu Glu Glu Lys Lys Arg Thr
260 265 270

Ala Arg Thr Asp Ala Trp Leu Gln Pro Gly Ile Val Val Lys Ile Ile
275 280 285

Thr Lys Lys Leu Gly Glu Lys Tyr His Lys Lys Lys Gly Val Val Lys
290 295 300

Glu Val Ile Asp Arg Tyr Thr Ala Val Val Lys Met Thr Asp Ser Gly
305 310 315 320

Asp Arg Leu Lys Leu Asp Gln Thr His Leu Glu Thr Val Ile Pro Ala
325 330 335

Pro Gly Lys Arg Val Leu Val Leu Asn Gly Gly Tyr Arg Gly Asn Glu
340 345 350

Gly Thr Leu Glu Ser Ile Asn Glu Lys Ala Phe Ser Ala Thr Ile Val
355 360 365

Ile Glu Thr Gly Pro Leu Lys Gly Arg Arg Val Glu Gly Ile Gln Tyr
370 375 380

Glu Asp Ile Ser Lys Leu Ala
385 390

<210> 26

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Gly Lys Ser Asp Phe Leu Thr Pro Lys Ala Ile Ala Asn Arg Ile
1 5 10 15

Lys Ser Lys Gly Leu Gln Lys Leu Arg Trp Tyr Cys Gln Met Cys Gln
20 25 30

Lys Gln Cys Arg Asp Glu Asn Gly Phe Lys Cys His Cys Met Ser Glu
35 40 45

Ser His Gln Arg Gln Leu Leu Ala Ser Glu Asn Pro Gln Gln Phe
50 55 60

Met Asp Tyr Phe Ser Glu Glu Phe Arg Asn Asp Phe Leu Glu Leu Leu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Phe Gly Thr Lys Arg Val His Asn Asn Ile Val Tyr Asn
85 90 95

Glu Tyr Ile Ser His Arg Glu His Ile His Met Asn Ala Thr Gln Trp
100 105 110

Glu Thr Leu Thr Asp Phe Thr Lys Trp Leu Gly Arg Glu Gly Leu Cys
115 120 125

Lys Val Asp Glu Thr Pro Lys Gly Trp Tyr Ile Gln Tyr Ile Asp Arg
130 135 140

Asp Pro Glu Thr Ile Arg Arg Gln Leu Glu Leu Glu Lys Lys Lys Lys
145 150 155 160

Gln Asp Leu Asp Asp Glu Glu Lys Thr Ala Lys Phe Ile Glu Glu Gln
 165 170 175

Val Arg Arg Gly Leu Glu Gly Lys Glu Gln Glu Val Pro Thr Phe Thr
 180 185 190

Glu Leu Ser Arg Glu Asn Asp Glu Glu Lys Val Thr Phe Asn Leu Ser
 195 200 205

Lys Gly Ala Cys Ser Ser Ser Gly Ala Thr Ser Ser Lys Ser Ser Thr
 210 215 220

Leu Gly Pro Ser Ala Leu Lys Thr Ile Gly Ser Ser Ala Ser Val Lys
 225 230 235 240

Arg Lys Glu Ser Ser Gln Ser Ser Thr Gln Ser Lys Glu Lys Lys Lys
 245 250 255

Lys Lys Ser Ala Leu Asp Glu Ile Met Glu Ile Glu Glu Lys Lys
 260 265 270

Arg Thr Ala Arg Thr Asp Tyr Trp Leu Gln Pro Glu Ile Ile Val Lys
 275 280 285

Ile Ile Thr Lys Lys Leu Gly Glu Lys Tyr His Lys Lys Lys Ala Ile
 290 295 300

Val Lys Glu Val Ile Asp Lys Tyr Thr Ala Val Val Lys Met Ile Asp
 305 310 315 320

Ser Gly Asp Lys Leu Lys Leu Asp Gln Thr His Leu Glu Thr Val Ile
 325 330 335

Pro Ala Pro Gly Lys Arg Ile Leu Val Leu Asn Gly Gly Tyr Arg Gly
 340 345 350

Asn Glu Gly Thr Leu Glu Ser Ile Asn Glu Lys Thr Phe Ser Ala Thr
 355 360 365

Ile Val Ile Glu Thr Gly Pro Leu Lys Gly Arg Arg Val Glu Gly Ile
 370 375 380

Gln Tyr Glu Asp Ile Ser Lys Leu Ala
 385 390

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 27

tcaaagacaa ctgttgctgg c

<210> 28
<211> 22
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 28
atacctcaa ctctgcgtcc tt 22

<210> 29
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 29
aagctgctgc agcagcttat cggg 24

<210> 30
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 30
ggtaccttta cacaagccct ctcgcc 26

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 31
ggtaccaggc cactgaagct gctgggg 27

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 32
atttacccaa ctattcacta 20

<210> 33
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 33
cctgaaatta ttgtgaaaat tataaccaag aaactggag agaaaatatca taagaaaaag 60
gctattgtta aggaagtaat tgacaaatat acagctgtt gtaagatgat tgattctgga 120
gacaagctga aacttgacca gactcattta gagacagtaa ttccagcacc aggaaaaaga 180
attcttagtt taaaatggagg ctacagagga aatgaagta ccctagaatc catcaatgag 240
aagactttt cagctactat cgtcattgaa actggccctt taaaaggacg cagagttgaa 300
ggaattcaat atgaagacat ttctaaactt gcc 333

<210> 34
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 34
ccggggatcg ttgtgaaaat tataacgaag aagcttgggg agaaaatatca caagaagaaa 60
ggggtcgtta aggaagtgtat tgacaggtac acagctgtgg taaagatgac tgactctgga 120
gacagggctga aactggacca gactcattta gagacagtca ttccggcccc ggggaaaagg 180
gttctatgttt taaatggagg ctacagagga aatgaaggca ctctcgaatc catcaatgag 240
aaggctttt cagccacgat agtcattgaa actggacctt tgaaaggacg cagagttgaa 300
ggtattcaat atgaagacat atctaaactt gct 333

<210> 35
<211> 310
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Pro Arg Gly Leu Ile Leu Glu Ile Leu Glu Val Ala Leu Leu Tyr Ser
1 5 10 15

Ile Leu Glu Ile Leu Glu Thr His Arg Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Leu
20 25 30

Glu Gly Leu Tyr Gly Leu Leu Tyr Ser Thr Tyr Arg His Ile Ser Leu
35 40 45

Tyr Ser Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Ile Leu Glu Val Ala
50 55 60

Leu Leu Tyr Ser Gly Leu Val Ala Leu Ile Leu Glu Ala Ser Pro Leu
65 70 75 80

Tyr Ser Thr Tyr Arg Thr His Arg Ala Leu Ala Val Ala Leu Val Ala
85 90 95

Leu Leu Tyr Ser Met Glu Thr Ile Leu Glu Ala Ser Pro Ser Glu Arg
100 105 110

Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Leu Tyr Ser Leu Glu Leu Tyr Ser Leu Glu
115 120 125

Ala Ser Pro Gly Leu Asn Thr His Arg His Ile Ser Leu Glu Gly Leu
130 135 140

Thr His Arg Val Ala Leu Ile Leu Glu Pro Arg Ala Leu Ala Pro Arg
145 150 155 160

Gly Leu Tyr Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Ile Leu Glu Leu Glu Val Ala
165 170 175

Leu Leu Glu Ala Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Thr Tyr Arg Ala
180 185 190

Arg Gly Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Gly Leu Gly Leu Tyr Thr His Arg
195 200 205

Leu Glu Gly Leu Ser Glu Arg Ile Leu Glu Ala Ser Asn Gly Leu Leu
210 215 220

Tyr Ser Thr His Arg Pro His Glu Ser Glu Arg Ala Leu Ala Thr His
225 230 235 240

Arg Ile Leu Glu Val Ala Leu Ile Leu Glu Gly Leu Thr His Arg Gly
245 250 255

Leu Tyr Pro Arg Leu Glu Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Ala
260 265 270

Arg Gly Val Ala Leu Gly Leu Gly Leu Tyr Ile Leu Glu Gly Leu Asn
275 280 285

Thr Tyr Arg Gly Leu Ala Ser Pro Ile Leu Glu Ser Glu Arg Leu Tyr
290 295 300

Ser Leu Glu Ala Leu Ala
305 310

<210> 36

<211> 311

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 36

Pro Arg Gly Leu Tyr Ile Leu Glu Val Ala Leu Val Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Ser Ile Leu Glu Ile Leu Glu Thr His Arg Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser
20 25 30

Leu Glu Gly Leu Tyr Gly Leu Leu Tyr Ser Thr Tyr Arg His Ile Ser
35 40 45

Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr Val Ala Leu Val
50 55 60

Ala Leu Leu Tyr Ser Gly Leu Val Ala Leu Ile Leu Glu Ala Ser Pro
65 70 75 80

Ala Arg Gly Thr Tyr Arg Thr His Arg Ala Leu Ala Val Ala Leu Val
85 90 95

Ala Leu Leu Tyr Ser Met Glu Thr Thr His Arg Ala Ser Pro Ser Glu
100 105 110

Arg Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Ala Arg Gly Leu Glu Leu Tyr Ser Leu
115 120 125

Glu Ala Ser Pro Gly Leu Asn Thr His Arg His Ile Ser Leu Glu Gly
130 135 140

Leu Thr His Arg Val Ala Leu Ile Leu Glu Pro Arg Ala Leu Ala Pro
145 150 155 160

Arg Gly Leu Tyr Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Val Ala Leu Leu Glu Val
165 170 175

Ala Leu Leu Glu Ala Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Thr Tyr Arg
180 185 190

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Gly Leu Gly Leu Tyr Thr His
195 200 205

Arg Leu Glu Gly Leu Ser Glu Arg Ile Leu Glu Ala Ser Asn Gly Leu
210 215 220

Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Pro His Glu Ser Glu Arg Ala Leu Ala Thr
225 230 235 240

His Arg Ile Leu Glu Val Ala Leu Ile Leu Glu Gly Leu Thr His Arg
245 250 255

Gly Leu Tyr Pro Arg Leu Glu Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Arg Gly
260 265 270

Ala Arg Gly Val Ala Leu Gly Leu Gly Leu Tyr Ile Leu Glu Gly Leu
275 280 285

Asn Thr Tyr Arg Gly Leu Ala Ser Pro Ile Leu Glu Ser Glu Arg Leu
290 295 300

Tyr Ser Leu Glu Ala Leu Ala
305 310

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁶: C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 14/47, A61K 38/17, 31/70		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/29845 (43) Date de publication internationale: 17 juin 1999 (17.06.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02667		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 9 décembre 1998 (09.12.98)			
(30) Données relatives à la priorité: 97/15536 9 décembre 1997 (09.12.97) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMIS- SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KANNOUCHE, Patri- cia [FR/FR]; 95, boulevard Bessières, F-75017 Paris (FR). MAUFFREY, Philippe [FR/FR]; 40, rue de la Solidarité, F-94400 Vitry-sur-Seine (FR). PINON-LATAILLADE, Ghislaine [FR/FR]; 33 bis, rue du Mont Valérien, F-92210 Saint-Cloud (FR). BIARD, Denis [FR/FR]; 34, rue Louis Duperrey, F-94320 Thiais (FR). ANGULO-MORA, Jaime, Francisco [FR/FR]; 20, avenue Beethoven, F-91470 Limours (FR).			
(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: SEQUENCES CODING FOR kin17 PROTEIN AND THEIR APPLICATIONS

(54) Titre: SEQUENCES CODANT POUR UNE PROTEINE kin17 ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

The invention concerns a DNAc sequence coding for human kin17 protein, DNAc sequences coding for a truncated kin17 protein, and use of said nucleic sequences and said proteins for regulating cell proliferation. The invention also concerns a method for detecting the human *Kin17* gene and the RNAm of the human *Kin17* gene, by *in situ* hybridization using oligonucleotides and/or by polymerase chain reaction (PCR). The invention further concerns expression vectors or plasmids expressing said proteins.

(57) Abrégé

Séquence d'ADNc codant pour la protéine kin17 humaine, séquence d'ADNc codant pour une protéine kin17 tronquée, ainsi qu'utilisation desdites séquences nucléiques et desdites protéines dans la régulation de la prolifération cellulaire. Procédé de détection du gène *Kin17* humain et de l'ARNm du gène *Kin17* humain, par hybridation *in situ* à l'aide d'oligonucléotides et/ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR). Vecteurs d'expression ou plasmides qui expriment les protéines précitées.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

SEQUENCES CODANT POUR UNE PROTEINE kin17 ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à la séquence d'ADNc codant pour la protéine kin17 humaine, aux séquences d'ADNc codant pour une protéine kin17 tronquée, appelée kin17ΔRH ainsi qu'à l'utilisation desdites séquences nucléiques et desdites protéines dans la régulation de la prolifération cellulaire.

La présente invention est également relative à une procédure de détection du gène *Kin17* humain et de l'ARNm du gène *Kin17* humain, par hybridation *in situ* à l'aide d'oligonucléotides et/ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR).

La présente invention est également relative à des vecteurs d'expression ou plasmides qui expriment les protéines précitées ainsi qu'aux bactéries contenant lesdits vecteurs ou plasmides.

La présente invention est également relative à l'utilisation desdits vecteurs pour la production et la purification de la protéine kin17 et de ses formes tronquées ou modifiées et comme médicament (thérapie génique).

Une protéine, dénommée kin17 a été mise en évidence chez la souris par J.F. Angulo et al. (*Mutation Res.*, 1989, 123-134) et est immunologiquement reliée à la protéine recA d'*E. coli* ; son identification a été possible à l'aide d'anticorps anti-recA d'*E. coli*, chez des cellules de rat FR 3T3. La production de cette protéine kin17 est induite par les agents génotoxiques, comme le rayonnement ultra-violet. Elle a une localisation préférentiellement nucléaire. De plus, elle est minoritaire parmi les protéines cellulaires et très sensible à la protéolyse enzymatique.

Elle est vraisemblablement impliquée dans le métabolisme de l'ADN, dans la mesure où elle augmente lors de certaines phases cellulaires de la synthèse de l'ADN et dans la réparation, dans la mesure où elle s'accumule dans le noyau après altération de l'ADN.

Il a été montré (D.S.F. Biard et al., *Radiation Research*, 1997, 147, 442-450) que l'expression de cette protéine kin17 chez le rat est augmentée en présence de radiations ionisantes et qu'elle intervient dans la réparation de l'ADN (A. Tissier et al., *Genomics*, 1996, 38, 238-242).

Poursuivant leurs travaux, J.F. Angulo et al. (Biochimie, 1991, 73, 251-256) ont caractérisé des anticorps anti-recA monospécifiques, aptes à être utilisés pour détecter l'expression de ladite protéine kin17 par des vecteurs d'expression. Ces Auteurs ont ainsi mis en valeur un fragment d'ADNc, dénommé *Kin17*₆₀₁, dérivé de 5 l'ARN embryonnaire de souris et exprimant un polypeptide (kin17₂₀₀) qui présente des réactions croisées avec les anticorps anti-recA.

La comparaison de la séquence du polypeptide (kin₂₀₀) codé par cet ADNc avec la séquence de la protéine recA a conduit à la mise en évidence de 10 séquences communes correspondant à des séquences situées entre les aminoacides 309-347 de la recA.

Dans *Nucleic Acids Research* (1991, 19, 5117-5123), J.F. Angulo et al. ont identifié et exprimé l'ADNc de *Kin17* (1414 pb) chez la souris en utilisant le fragment *Kin17*₆₀₁ précédent, comme sonde.

L'ADNc *Kin17* de souris présente un seul cadre de lecture ouvert, 15 entre les positions 25 et 1198, qui code pour une protéine de 391 aminoacides (protéine _{Mm}kin17), qui présente un domaine de liaison au zinc (motif en « doigt de zinc ») entre les résidus 28 et 50 et un déterminant antigénique du même type que celui de la protéine recA entre les positions 162 et 201.

Cette protéine présente un signal de localisation nucléaire, situé 20 entre les positions 240 et 256, qui semble similaire à ceux identifiés dans certaines protéines nucléaires et qui est fonctionnel.

La localisation chromosomique du gène codant pour la protéine kin17 murine a été effectuée par hybridation *in situ*, sur le chromosome 2, chez la souris. Le gène *Kin17* humain est localisé sur le chromosome 10p15-p14.

25 Le motif en « doigt de zinc » est impliqué dans la liaison de la protéine kin17 à l'ADN double-brin.

La protéine kin17 se lie préférentiellement à l'ADN courbe ; son efficacité de liaison est corrélée à l'importance de la courbure de l'ADN.

30 Deux protéines présentant différentes modifications (délétions), soit au niveau du motif en « doigt de zinc » (kin17 Δ1), soit au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine (kin17 Δ2), conservent la propriété de se lier préférentiellement

ment à l'ADN courbe ; ces propriétés montrent que le motif en « doigt de zinc » n'est pas essentiel pour une liaison préférentielle à cet ADN courbe et qu'un autre domaine reconnaissant l'ADN courbe est impliqué (Mazin et al., N.A.R., 1994, 22, 20, 4335-4341) et est situé entre les aminoacides 71 et 281.

5 Poursuivant leurs travaux, J.F. ANGULO et al. ont également montré la présence de protéine kin17 chez d'autres mammifères que la souris et notamment chez l'homme. Par exemple, D.S.F. Biard et al. (*Arch. Dermatol. Res.*, 1997, 289, 448-456) ont détecté, à l'aide d'anticorps anti-kin17 de souris la protéine kin17 humaine ($_{HS}kin17$) dans les cellules de la peau et ont montré que les taux de 10 protéine $_{HS}kin17$ augmentent dans les kératinocytes épithéliaux en phase de prolifération (après 7 jours de culture) alors que ces taux chutent en phase de différenciation.

Cependant, malgré la détection de la protéine $_{HS}kin17$, il n'a pas été possible jusqu'à présent d'isoler effectivement la séquence codante de cette protéine humaine et ce même en utilisant des sondes d'origine murine.

15 Par exemple, le fragment d'acide nucléique, d'origine humaine, décrit dans le Brevet français n° 2 706 487 ne permet pas d'exprimer la protéine kin17 humaine, ni d'isoler la séquence nucléique complète apte à une expression effective de cette protéine $_{HS}kin17$.

Les Inventeurs ont maintenant trouvé que, de manière surprenante, 20 l'expression de la protéine kin17 de mammifère (notamment souris et homme) est corrélée, de manière générale, avec la prolifération cellulaire ; ils ont en particulier trouvé que la protéine kin17 inhibe la prolifération cellulaire ; en outre, une surexpression de protéine kin17 ou d'un fragment C-terminal de ladite protéine kin17 inhibent drastiquement la prolifération cellulaire.

25 Ils ont, en outre trouvé, qu'une protéine tronquée (délétion d'un fragment comprenant la région homologue (RH) entre la protéine kin17 et la protéine RecA était encore plus active dans l'inhibition de la prolifération cellulaire.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à des médicaments aptes à réguler la prolifération cellulaire, à base de ces séquences.

La présente invention a pour objet une séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO:1 et en ce qu'elle est apte à exprimer une protéine kin17 humaine fonctionnelle.

La présente invention a également pour objet une séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine kin17 tronquée au niveau 5 de la région homologue à la protéine recA.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite séquence d'acide nucléique, elle code pour une protéine kin17 tronquée qui correspond à une protéine kin17 dans laquelle au moins le fragment compris entre les aminoacides 162 et 201 et 10 au plus le fragment compris entre les aminoacides 55-235 est déleté.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite séquence d'acide nucléique code pour une protéine kin17 tronquée qui correspond à la protéine kin17 de souris dans laquelle le fragment compris entre les aminoacides 129-228 est déleté et présente la séquence SEQ ID NO:2.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, 15 ladite séquence d'acide nucléique code pour une protéine kin17 tronquée qui correspond à la protéine kin17 humaine dans laquelle le fragment 129-228 est déleté et présente la séquence SEQ ID NO:3.

La présente invention a également pour objet des fragments, de 20 à 20 40 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:1, pour la détection du gène codant pour la protéine kin17 humaine et/ou de l'ARN du gène *Kin17* dans un échantillon biologique.

De tels fragments servent notamment d'amorces pour la PCR, la RT-PCR ou l'hybridation *in situ*. Selon les cas, ils peuvent avantageusement être marqués 25 à l'aide d'un marqueur non-radioactif convenable (substances fluorescentes, ligands tels que la biotine ou un haptène).

Parmi lesdits fragments, on peut citer en particulier les séquences SEQ ID NO:5-21, répertoriées dans le Tableau ci-après, ainsi que les séquences SEQ ID NO:33 et 34.

5

10

15

20

25

30

Hu89D (SEQ ID NO:5)	CTCAGGAGACCGCTTGGCACTA
Hu857R (SEQ ID NO:6)	CCTGGTGCTGGAATTACTGTC
Hu3r (SEQ ID NO:7)	TCTTTCGTTCACTGATGCT
Hu4d (SEQ ID NO:8)	GGGAGAGAAATATCATAAGAAAA
Hu5d (SEQ ID NO:9)	TCCCTCTGTAGCCCTCCCATT
Hu6d (SEQ ID NO:10)	TTTCAGCTACTATCGTTCA
Hu8d (SEQ ID NO:11)	CGAGTGCAGTAAGACGATAGG
Hu9r (SEQ ID NO:12)	ATTCTTTCGTTCACTGAT
Hu10r (SEQ ID NO:13)	GGCAATACCAGCGTAGCTCTGCAGC
Hu11r (SEQ ID NO:14)	CTCTGATGAGATTGGACATACAAT
Hu12r (SEQ ID NO:15)	TCTCCTGAGAAGTTCTAGAAA
Hu-KPNd (SEQ ID NO:16)	ACTGCCAATTTATTGAAGAGCAAGTGAGAAGAGGCCTGG
Hu-KPNr (SEQ ID NO:17)	CCAGGCCTTCTCACTTGCTCTCAATAAAATTGGCAGT
HsKin10d (SEQ ID NO:18)	AGAAAGTGATCGCTGCCGTGGT
HsKin1251r (SEQ ID NO:19)	GCGAACACCAATTGATGCTTTAAGA
Hu174D (SEQ ID NO:20)	TCAGAGACAATTGCTGGC
Hu1170R (SEQ ID NO:21)	ATTCCCTCACTCTGCGTCCTT

La présente invention a également pour objet des fragments de la séquence SEQ ID NO:1, aptes à servir de sonde pour l'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN ; parmi de tels fragments, on peut citer la séquence SEQ ID NO:4, correspondant aux positions 207-1208 de la séquence SEQ ID NO:1 (sonde 1000) et les séquences SEQ ID NO:1 et 5 à 21.

La présente invention a également pour objet des fragments d'une séquence d'acide nucléique codant pour un segment d'une protéine kin17 de mammifère (séquences SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:24), lesquels fragments comprennent entre 300 et 360 nucléotides codant pour la partie C-terminale de ladite protéine kin17 et sont aptes à contrôler la prolifération cellulaire.

Selon un mode de réalisation avantageux desdits fragments, il sont sélectionnés dans le groupe constitué par la SEQ ID NO:33 et la SEQ ID NO:34.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de l'ADN génomique ou d'un produit de transcription du gène humain *Kin17*, par

hybridation et/ou amplification génique, réalisé à partir d'un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) une étape au cours de laquelle l'on met en contact un échantillon biologique à analyser avec au moins une sonde sélectionnée dans le groupe constitué 5 par les séquences SEQ ID NO:1-21 et

(2) une étape au cours de laquelle on détecte par tout moyen approprié le ou les produits résultant de l'interaction séquence nucléotidique-sonde.

Conformément audit procédé, il peut comprendre, préalablement à l'étape (1) :

10. - une étape d'extraction de l'acide nucléique à détecter, et
- au moins un cycle d'amplification génique réalisé à l'aide d'une paire d'amorces sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO:5-21.

15. Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la sonde de l'étape (1) est éventuellement marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, ladite sonde est constituée par la séquence SEQ ID NO:4.

20. Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ladite paire d'amorces est constituée par une séquence SEQ ID NO:16 appariée avec une séquence SEQ ID NO:17.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'un produit de transcription du gène humain *Kin17*, caractérisé en ce qu'il comprend :

25. - une étape d'extraction de l'ARN à détecter,
- une étape de synthèse de l'ADNc correspondant audit ARN par transcription inverse en présence d'amorces aléatoires,
- au moins un cycle d'amplification génique réalisé à l'aide d'une paire d'amorces sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO:5-21, et
- la détection du produit amplifié.

30. Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ladite paire d'amorces est sélectionnée dans le groupe constitué par les paires suivantes :

séquences SEQ ID NO:5 et SEQ ID NO :12, qui permettent d'amplifier un fragment de 453 pb (fragment A) ; séquences SEQ ID NO: 18 et SEQ ID NO:19, qui permettent d'amplifier un fragment de 1265 pb (fragment B) et séquences SEQ ID NO:16 et SEQ ID NO:7, qui permettent d'amplifier un fragment de 224 pb (fragment C).

5 De manière avantageuse, les fragments d'ADNc amplifiés sont séparés par électrophorèse, de préférence sur gel d'agarose, visualisés en présence de bromure d'éthidium et quantifiés à l'aide du logiciel NIH image (National Institute of Health, USA).

Conformément à l'invention, elle englobe également les réactifs de 10 détection d'une séquence nucléique codant pour une protéine kin17 de mammifère ou un fragment modifié de ces séquences, caractérisés en ce qu'ils incluent les séquences SEQ ID NO:4-21, 33 et 34 ainsi que les fragments A de 453 pb, B de 1265 pb et C de 224 pb, éventuellement marqués.

15 La présente invention en outre pour objet une protéine kin17 Δ RH, caractérisée en ce qu'elle correspond à une protéine kin17 tronquée au niveau d'une région homologue de la protéine recA.

20 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine kin17 Δ RH tronquée, elle correspond à une protéine kin17 dans laquelle au moins le fragment compris entre les aminoacides 162 et 201 et au plus le fragment compris entre les aminoacides 55-235 est déleté.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite protéine kin17 Δ RH tronquée correspond à la protéine kin17 de souris dans laquelle le fragment compris entre les aminoacides 129-228 est déleté et présente la séquence SEQ ID NO:22 (séquence dénommée _{Mm}kin17 Δ RH).

25 Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite protéine kin17 Δ RH tronquée correspond à une protéine kin17 humaine dans laquelle le fragment 129-228 est déleté et présente la séquence SEQ ID NO:23 (séquence dénommée _{HS}kin17 Δ RH).

30 La présente invention a également pour objet des fragments de protéine kin17, caractérisés en ce qu'ils comprennent entre 100 et 120 acides aminés

et sont situés en position C-terminale ; ils sont de préférence sélectionnés dans le groupe constitué par la SEQ ID NO:35 et la SEQ ID NO:36.

De tels fragments inhibent, de manière inattendue, la prolifération cellulaire ; la séquence SEQ ID NO:35 correspond aux résidus 283-393 de la séquence humaine de kin17 (SEQ ID NO:26) ; la séquence SEQ ID NO:36 correspond aux résidus 281-391 de la séquence de souris de kin17 (SEQ ID NO:25).

La présente invention a également pour objet l'utilisation du fragment compris entre les aminoacides 55-235, éventuellement muté, de préférence le fragment compris entre les aminoacides 129 et 228 d'une protéine kin17 de mammifère, pour la régulation de l'interaction protéine-ADN courbe.

En effet, l'obtention de mutants dans ce domaine d'interaction protéine-ADN courbe constitue un outil de choix pour bloquer certains processus biologiques comme la prolifération, la traduction ou l'intégration du virus du SIDA dans le génome humain ou pour transporter des protéines effectrices par la construction de fusions protéiques domaine de fixation à l'ADN courbe-enzyme de réparation, à des endroits où l'ADN est courbe ou courbé.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine kin17 de mammifère ou d'un fragment C-terminal de 100 à 120 acides aminés de ladite protéine kin17, pour la préparation d'un médicament régulant la prolifération cellulaire ou la fertilité.

Conformément à l'invention, on utilise ladite protéine kin17 de mammifère ou ledit fragment C-terminal de 100 à 120 acides aminés, pour la préparation d'un médicament inhibant la prolifération cellulaire, notamment destiné au traitement des maladies dans lesquelles on observe une hyperprolifération cellulaire.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ladite séquence est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:22, 23, 25, 26, 35 et 36.

La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il inclut une séquence codant pour une protéine kin17 de mammifère ou pour un fragment de celle-ci sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 2, 3, 33, 34.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, ladite séquence codant pour ladite protéine kin17 ou ledit fragment de celle-ci est fusionnée avec un gène qui code pour une protéine fluorescente.

De tels vecteurs sont notamment utiles :

5 - pour la préparation d'un médicament contrôlant la prolifération cellulaire,

- comme outil de détection, notamment pour visualiser les sites et la progression de la réparation de l'ADN et les centres de biosynthèse intranucléaire.

De manière avantageuse, ledit vecteur est associé à des séquences 10 appropriées de régulation.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un vecteur d'expression incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 2, 3, 24, 33 et 34 pour la préparation d'un médicament contrôlant la prolifération cellulaire.

15 De manière préférée, ledit vecteur est un plasmide, il peut être gardé dans des bactéries telles que *E. coli* ; on peut citer, à titre d'exemple, la bactérie *MOSBlue* (Amersham, France), qui possède le génotype suivant :

end AI hsdR17 (^r_{k12}-^m_{k12}+)sup E44 thi-1 rec AI gyr A96 rel AI lac [F' pro A⁺ B⁺ lac_qI^q 2ΔM15::Tn10(Tc^R)].

20 On obtient ainsi des bactéries cMOS transformées :

- bactérie PK1 : bactérie cMOS transformée avec le plasmide pMOSBlue (Amersham, France) dans lequel l'ADNc *HSKin17* (défini par la SEQ ID NO:1) a été introduit ;

- bactérie PK2 : bactérie cMOS transformée avec le plasmide 25 pCMVDT21 (Bourdon et al., 1997, Oncogene) dans lequel l'ADNc *HSKin17* (défini par la SEQ ID NO:1) a été introduit.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux 30 dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la détection des produits PCR par électrophorèse sur gel. L'ADN est révélé par coloration au bromure d'éthidium. Comme marqueurs de poids moléculaire, des fragments d'ADN de taille connue sont présents dans la colonne A.

5 - les figures 2A et 2B illustrent la comparaison des séquences nucléiques (figure 2A) et protéiques (figure 2B) *HSKin17* et *MmKin17*. Nucléotides = 86 % d'identité, acides aminés = 92,4 % d'identité.

10 - la figure 3 représente une autoradiographie de l'analyse par hybridation des ARN totaux extraits de différents tissus humains (panneau A) ou de différentes cellules tumorales humaines (panneau B), avec la Sonde-1000 (SEQ ID NO:4).

15 - la figure 4 illustre la détection de l'ARN messager du gène *Kin17* dans le testicule de souris par hybridation *in situ*.

20 - la figure 5 est une représentation schématique des protéines produites par transfection transitoire. La séquence des acides aminés est représentée de façon linéaire. Le nom des protéines est indiqué à gauche de chaque protéine et la taille est mentionnée à droite.

25 - la figure 6 illustre la détection des cellules HeLa transfectées avec le vecteur pCMV_{Mm}Kin17. Les noyaux sont colorés en bleu grâce au DAPI. La coloration intranucléaire verte correspond à la localisation de la protéine _{Mm}kin17 ; la figure 6A illustre la détection de _{Mm}kin17 dans des cellules qui expriment un taux faible de protéine _{Mm}kin17 et la figure 6B illustre la détection de _{Mm}kin17 dans des cellules qui expriment un taux fort de protéine kin17 ; agrandissement : x 1000.

30 - la figure 7 représente des cellules HeLa qui expriment un taux faible de protéine _{Mm}kin17 (avec des foyers intranucléaires présentant un diamètre d'environ 0,5 µm ; panneau A) ou des cellules qui expriment un taux fort de protéine kin17 (détection des déformations de la morphologie nucléaire DMN ; panneau B).

- la figure 8 représente l'immunodétection de la protéine _{Mm}kin17ΔRH dans les cellules HeLa transfectées par le plasmide pCMVKin17ΔRH. Utilisation de pAbanti-RecA comme premier anticorps (panneau A). Détection avec l'anticorps pAb2064 (panneau B).

- la figure 9 correspond à l'analyse par immunocytochimie et par microscopie en contraste de phase des cellules HeLa qui surproduisent la protéine $M_{m}kin17\Delta CT$.

5 - la figure 10 montre que la déformation de la morphologie nucléaire est corrélée à une inhibition de la réplication de l'ADN. La figure 10A représente l'immunodétection de la protéine $M_{m}kin17\Delta RH$ (en rouge) et l'incorporation de BrdU (en vert) dans les cellules HeLa exprimant la protéine $M_{m}kin17\Delta RH$. Le BrdU (Bromodésoxyuridine) est un analogue de nucléotide (thymidine) qui s'incorpore dans l'ADN au cours de la réplication. La figure 10B est un tableau récapitulatif qui montre 10 l'inhibition de la réplication de l'ADN après formation des déformations de la morphologie nucléaire (DMN), due à l'expression des protéines $M_{m}kin17\Delta RH$ ou $M_{m}kin17$.

- la figure 11 illustre la carte génétique des plasmides pEBVMT Δ (pB220) et pEBVMT $M_{m}kin17$ (pB223).

15 - la figure 12 illustre l'analyse en cytométrie à balayage laser de la protéine $M_{m}kin17$ dans les cellules du clone B223.1 : 9 mois après la transfection, à la fois les cellules B223.1 et les cellules B220 sont ensemencées à raison de 3.10^4 cellules/cm 2 , trois jours avant de commencer le traitement aux métaux lourds ($ZnCl_2$ 100 μM et $CdSO_4$ 1 μM). 24 heures après, les cellules sont fixées et colorées avec un 20 anticorps anti-RecA spécifique de la protéine $M_{m}kin17$. La détection immunocytochimique est réalisée à l'aide du cytomètre ACAS 570 (Meridian Inc.). Les panneaux A et B correspondent aux cellules B223.1, avec ou sans métaux lourds ; les panneaux C et D correspondent aux cellules B220 avec ou sans métaux lourds. Chaque section 25 est analysée en même temps pour la protéine $M_{m}kin17$ (panneau gauche) et l'iodure de propidium (PI) (panneau droit). Les intensités de fluorescence spécifiques à la protéine $M_{m}kin17$ et au PI sont représentées avec des échelles de fluorescence arbitraires.

- la figure 13 illustre la détection immunocytochimique de la protéine $M_{m}kin17$ dans les cellules du clone B223.1 : 6 mois après la transfection, les

cellules B223.1 et B220 sont ensemencées à raison de 6.10^4 cellules ou 10^4 cellules/cm², respectivement et traitées, dans les mêmes conditions que celles exposées pour la figure 12. La coloration est réalisée avec l'anticorps anti-RecA. Les panneaux A et B correspondent aux cellules B223.1 avec ou sans métaux lourds ; les panneaux 5 C et D correspondent aux cellules B220 avec ou sans métaux lourds. On utilise un anticorps anti-RecA et un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Cy2TM pour détecter la protéine _{Mm}kin17. La fluorescence est analysée avec un programme Visiolab 1000 (Biocom) couplé à un microscope Axiophot 2 (Zeiss) et une caméra refroidie, comme précisé ci-dessus (agrandissement de chaque panneau : x 100).

10 - la figure 14 montre des cellules polynucléées B223.1 surexprimant la protéine _{Mm}kin17 : 8 mois après la transfection, des cellules B223.1 sont ensemencées comme précisé ci-dessus (voir figure 12). 24 heures après le traitement aux métaux lourds (100 μ M ZnCl₂ et 1 μ M de CdSO₄), les cellules sont fixées et colorées avec un anticorps anti-RecA. Agrandissement : (A) x 504 ; (B et C) x 1000 ; (D et 15 F) x 1260 ; (E) x 2000. La fluorescence est analysée avec un programme Visiolab 1000.

20 - la figure 15 illustre l'analyse du cycle cellulaire dans des cellules HEK293 surexprimant la protéine _{Mm}kin17 : 6 mois après la transfection, les cellules sont ensemencées aux mêmes dilutions et trois jours après un traitement aux métaux lourds pendant 24 heures. Les cellules sont récupérées et analysées. Les flèches indiquent les cellules polynucléées.

25 - la figure 16 illustre l'influence de la surproduction de la protéine _{Mm}kin17 sur l'efficacité des cellules B223.1 à former des clones : 8 mois après la transfection, les cellules B220, B223.1 et B223.2 sont ensemencées à 10^3 , 10^2 et 10^1 cellules/cm², en présence d'hygromycine B (125 μ g/ml). Après 10, 12 et 18 jours en culture, respectivement, les cellules sont fixées et colorées.

30 - la figure 17 illustre le taux de prolifération des cellules B223.1 : à différents moments après la transfection, la croissance cellulaire est évaluée. (A) : des cellules sont ensemencées à la même dilution (10^3 cellules/cm²) en présence d'hygromycine B (125 μ g/ml). À différents moments après l'ensemencement, les

cellules sont trypsinisées et comptées. (B) : pour évaluer l'efficacité à former des clones, les trois lignées cellulaires sont évaluées à différentes densités : $10^3/\text{cm}^2$ pour les cellules B220, $2.10^3/\text{cm}^2$ pour les cellules B223.2 et $10^4/\text{cm}^2$ pour les cellules B223.1. Les expériences sont réalisées en présence ou en l'absence d'hygromycine B (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pour chaque courbe, la moyenne de trois boîtes de culture est calculée : -○- : cellules B220 sans hygromycine ; -●- : cellules B220 avec hygromycine ; -□- : cellules B223.1 sans hygromycine ; -■- : cellules B223.1 avec hygromycine ; -▲- : cellules B223.2 sans hygromycine ; -△- : cellules B223.2 avec hygromycine.

- la figure 18 illustre la détection, *in vivo* par fluorescence, des protéines de fusion GFP-kin17 Δ CT (à gauche) et GFP-kin17SLN-CT (à droite) après transfection des cellules HeLa avec les plasmides pEGFP-Kin17 Δ CT et pEGFP-Kin17SLN-CT respectivement.

Dans ces figures, les différentes colorations apparaissent sous forme grisée.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1: Procédé de clonage de l'ADNc du gène Kin17 humain (HSKin17).

Pour isoler l'ADNc du gène *HSKin17*, des cellules lymphoblastoïdes humaines, appelées cellules Boleti, qui possèdent un caryotype normal, ont été utilisées. 10^7 cellules ont été traitées avec une solution dénaturante ; les protéines ont été éliminées après centrifugation à 12000 rpm pendant 20 min. à 4°C (RNA-B, Bioprobe, France). Les ARNs totaux sont récupérés dans la phase aqueuse et précipités par addition d'un volume d'alcool isopropylique à -20°C et centrifugés. Après resuspension dans 1 ml d' H_2O distillée, les ARNs sont de nouveau précipités à -20°C dans un volume d'alcool isopropylique et 0,2 M de NaCl. Après récupération par centrifugation et rinçage avec de l'éthanol à 70 %, les ARNs sont remis en suspension dans de l'eau et conservés à -80°C. Les ARNs ainsi obtenus ont été utilisés par la suite dans la réaction de transcription inverse (RT) des ARNs, pour la synthèse des ADNs complémentaires correspondants. Les ADNc obtenus sont traités par une réaction de

polymérisation en chaîne (PCR), en présence d'une polymérase thermostable, pour obtenir un fragment de l'ADNc *HSKin17*.

Obtention d'un fragment de 1000 nucléotides de l'ADNc humain par RT-PCR.

5 Des oligonucléotides, dérivés de la séquence nucléotidique de l'ADNc *Kin17* de souris (couple d'oligonucléotides SEQ ID NO:27 = TCAAAGACAACTGTTGCTGGC et SEQ ID NO:28 = ATACCTTCAACTCTGCGTCCTT) ont été utilisés de la façon suivante: 1 µg d'ARN totaux ont été mélangé à 5 mM de MgCl₂, 1X tampon de PCR, 1 mM de dNTPs, 10 1 U/ml d'inhibiteur de RNase, 2,5 mM d'oligo d(T)₁₆ et 2,5 U/ml de transcriptase inverse. Le mélange est incubé 20 min. à température ambiante pour permettre à la séquence d'oligo d(T)₁₆ d'hybrider avec les extrémités polyA⁺ des ARNs et d'initier la transcriptase inverse. Le mélange est ensuite incubé 20 min. à 42°C puis 5 min. à 99°C et 5 min à 5°C. Ces différentes incubations permettent la transcription inverse 15 des ARN messagers en ADN complémentaire. La PCR est réalisée en utilisant les oligonucléotides SEQ ID NO:27 et 28 précités. Après PCR, les produits de l'amplification ont été séparés dans un gel d'agarose à 1,5 %. La présence d'ADN est révélée par du bromure d'éthidium (figure 1). Les marqueurs de taille présents dans la colonne A de la figure 1, ont permis de déterminer la taille des produits 20 d'amplification. Un fragment d'ADN de 1000 paires de bases est clairement détectable dans le cas d'une amplification réalisée sur l'ADNc obtenu (colonne C). Par contre, on constate que lorsque l'on omet de mettre l'enzyme qui permet l'étape de transcription inverse, ce fragment d'ADN est absent (colonne B). Ceci démontre bien 25 la présence de l'ARN messager *HSKin17* dans les cellules humaines ; le fragment de 1000 paires de bases obtenu (SEQ ID NO:4) n'est pas dû à une contamination d'ADN génomique.

La séquence du fragment de 1000 paires de bases est déterminée selon la technique de séquençage automatique décrite dans Tissier A. et al., 1996, précité. La séquence SEQ ID NO:4, correspondant à un fragment de l'ADNc *HSKin17* est 30 identique à 86 % à celle de souris *MmKin17*. Le polypeptide codé est identique à 92,4 %. C'est l'isolement de ce fragment de l'ADNc *HSKin17* qui a effectivement permis

d'entreprendre le clonage de l'ADNc *HSKin17* complet (Figure 2 : Comparaison des séquences des fragments d'ADNc *HSKin17* avec l'ADNc *Kin17* de souris).

EXEMPLE 2 : Criblage d'une banque d'ADNc humain : clonage et détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN complémentaire du gène *HSKin17*.

5 Le fragment radiomarqué de 1000 paires de bases de l'ADNc du gène *HSKin17* (appelée Sonde-1000; SEQ ID NO:4) a été utilisé comme sonde pour cibler une banque d'ADNc humains obtenus à partir d'ARNs messagers exprimés dans des testicules et insérés dans le vecteur λ gt11. L'ADN des phages qui hybrident avec la sonde ont été purifiés et l'ADNc humain a été séquencé.

10 **PROTOCOLE :** La banque a été obtenue à partir d'ARN poly A+ purifiés à partir de testicules humains. Les ADN complémentaires ont été obtenus en utilisant comme amorce une séquence de poly d(T). Après transcription inverse et dégradation des ARNs qui ont servi de matrice, des séquences nucléotidiques correspondant au site de restriction de l'enzyme de digestion EcoRI ont été greffées de part 15 et d'autre des extrémités des ADNc. Après digestion par l'enzyme EcoRI, tous les ADNc sont insérés au site EcoRI du vecteur λ gt11. 250 000 bactériophages λ gt11 recombinants contenant des ADNc humains sont incubés 20 min. à 37°C avec 0,3 ml de bactéries réceptrices 6334 (préculture de 16 h à 37°C), puis mélangés avec 9 ml de milieu LB agarose, chauffé à 48°C. L'ensemble est coulé sur des boîtes de Pétri de 20 140 mm de diamètre contenant du milieu LB agar. Les boîtes ont été incubées à 42°C pendant 5 heures puis à 37°C, 16 h, jusqu'à ce que les plages de lyses arrivent à confluence. Un filtre de nitrocellulose sec (Schleicher & Shuell, BA85) est ensuite déposé pendant 1 min. sur la surface de la boîte, marquée de façon asymétrique avec de l'encre de chine. On obtient de cette façon une réplique des plages de lyse sur le 25 filtre. Le fragment de 1000 paires radiomarqué (Sonde-1000) (SEQ ID NO:4) de l'ADNc du gène *HSKin17* est utilisé pour le criblage selon les traitements suivants :

a) Dénaturation et immobilisation de l'ADN du bactériophage λ gt11 sur des filtres de nitrocellulose.

Les filtres sont placés pendant 5 min., face en contact avec les 30 phages vers le haut, sur des feuilles de papier Whatmann imbibées de solution dénatrante (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl), pour permettre la lyse des phages et la dénaturation

de l'ADN. Les filtres sont ensuite transférés pendant 5 min. dans la solution de neutralisation (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH = 7,4), puis lavés pendant 10 min. dans du tampon 2X SSC, et ensuite séchés à 80°C, sous vide, pendant 2 heures. Une deuxième série des filtres est mise en contact pendant 2 min. avec les plages de lyses, 5 à la surface de la boîte. Ils seront traités de la même façon que la première empreinte. Les boîtes contenant les phages sont conservées à 4°C dans l'obscurité. L'ADN fixé sur les filtres est alors hybridé avec la sonde-1000 radiomarquée (Maniatis et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 1989). La deuxième série des filtres avec des empreintes ont été hybridés avec une sonde radiomarquée correspondant à l'ADNc 10 *Kin17* de souris (Angulo et al., N.A.R., 1991, précité).

b) Hybridation des ADNs recombinants et détection des phages qui s'hybrident avec la sonde.

Six filtres ont été placés chacun dans un tube et incubés pendant 3 heures à 65°C dans la solution d'hybridation (5 X SSPE, 5 X Denhardt's solution, 15 0,5 % SDS), en présence de 50 µg/ml final d'ADN de sperme de hareng soniqué (préalablement dénaturé à 100°C, pendant 10 min., puis placé dans la glace).

b-1)- Marquage radioactif des sondes : 30 ng d'ADN correspondant au fragment de 1000 pdb de l'ADNc *HSKin17* (sonde -1000 de séquence SEQ ID NO:4) ou correspondant à l'ADNc *Kin17* de souris (sonde-1400) ont été chauffés 20 10 min. à 100°C et incubés en présence d'amorces (hexamères), d'un désoxyribonucléotide marqué au phosphore radioactif ($[\alpha\text{-}32\text{P}]\text{-dCTP}$), des trois autres désoxyribonucléotides triphosphates non radioactifs et de la fraction Klenow de la polymérase I d'*E. coli*. Le marquage est effectué à 37°C pendant 30 min., puis la sonde est purifiée sur tamis moléculaire (SEPHADEX G50, Pharmacia). Le taux d'incorporation 25 de la radioactivité est mesuré à l'aide d'un compteur à scintillation liquide. L'activité spécifique des sonde-1000 et sonde-1400 étaient de $0,8\text{-}3 \times 10^8$ cpm/µg (*Random Primed DNA Labeling Kit*, Boehringer).

b-2)- Hybridation: Les filtres sont incubés dans la solution d'hybridation dans laquelle la sonde-1000 (SEQ ID NO:4) ou la sonde-1400 radio-marquée (préalablement dénaturée à 100°C pendant 10 min.) a été ajoutée. 30

L'incubation est réalisée pendant 16 heures à 65°C. Après hybridation, les filtres sont lavés de la façon suivante :

3 lavages de 10 min. dans du tampon 2 X SSC, 0,1 % SDS à température ambiante,

1 lavage de 45 min. dans du tampon 1 X SSC, 0,1 % SDS à 65°C.

5 Après élimination de l'excès de radioactivité, les filtres sont mis en contact avec des films X-OMAT AR (Kodak) qui sont placés à - 80°C pendant 16 heures.

c) Isolement des phages qui possèdent l'ADNc du gène HS_{Kin17}.

Les plages de lyse qui ont donné un résultats positif par autoradiographie ont été repérées sur les boîtes de Pétri et prélevées et remises en suspension 10 dans 100-300 µl de tampon SM (0,1 M NaCl, 10⁻³ M SO₄, 0,02 M Tris-HCl pH 7,5, 0,01 % de gélatine) contenant 5 µl de chloroforme. Le même protocole utilisé pour le criblage permet par la suite de purifier les phages positifs ainsi que leur ADN pour déterminer la taille des inserts et la séquence de l'ADNc.

15 **Purification de l'ADN du phage λgt11 et détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN complémentaire du gène HS_{Kin17}.**

On procède comme décrit dans le Brevet français n° 2 706 487.

EXEMPLE 3 : Méthodes de caractérisation de l'expression du gène Kin17 par détection de l'ARN messager et de la protéine codée.

20 ***Immunodétection de la protéine kin17 (de souris et humaine) dans des cellules en culture.***

Les cellules cultivées sur lamelles sont lavées 3 fois avec du PBS, puis fixées à l'aide d'une solution de méthanol acétone (3v/7v) pendant 10 minutes à - 20°C. L'immunodétection est ensuite réalisée à température ambiante en chambre humide. Après réhydratation des cellules pendant 10 min. dans du PBS, les lamelles 25 sont incubées 10 min. dans une solution de 3% de H₂O₂ dans du PBS. Après 3 lavages de 5 min. avec du PBS, les lamelles sont incubées 30 min. dans 5 % de sérum de chèvre dans du PBS. Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois 5 min. dans du PBS, puis incubées pendant 2 heures avec un anticorps dirigé contre la protéine kin17, dénommé 30 pAb2064 (Biard et al., Arch. Dermatol., 1997, précité) ou un anticorps anti-RecA, dilué au 1/100 dans du PBS. Après 3 rinçages de 5 min. dans du PBS, les lamelles

sont incubées avec un anticorps anti-immunoglobulines de lapin biotinylé, produit chez la chèvre, dilué au 1/200 dans du PBS. Après 3 lavages de 5 min. dans du PBS, les lamelles sont recouvertes pendant 30 min. avec le réactif ABC (Vectastain, Elite ABC Kit, Vector Laboratories) qui contient de l'avidine et de la peroxydase de raifort biotinylée, puis de nouveau rincées 3 fois 5 min. dans du PBS. La peroxydase est révélée par la diaminobenzidine (Polysciences Inc.), utilisée à la concentration de 0,5 mg/ml en présence de 0,01% de H_2O_2 dans du tampon Tris pH 7,4. La réaction est arrêtée après quelques minutes, par immersion des lamelles dans l'eau. Les lamelles sont ensuite montées avec Aquamount amélioré (BDH, Gurr) et observées avec un microscope AXIOPHOTE 2 de Carl ZEISS équipé pour l'immunofluorescence indirecte et avec une caméra refroidie (caméra CCD, Coolview, Photonic Science, UK) qui est contrôlée par un ordinateur.

Détection de l'ARN messager du gène HSKin17 par hybridation in situ dans les lymphocytes T.

Les lymphocytes humains, déposés sur les lames par cytocentrifugation, ont été fixés avec du paraformaldéhyde à 4 % pendant 10 min., rincés au PBS puis déshydratés par passages successifs dans des solutions à 70 %, 90 % et 100 % d'alcool, avant d'être conservés à -80°C. Après hydratation dans du PBS, toutes les étapes de la détection ont été réalisées dans une chambre humide. Les lames sont incubées pendant 10 min. avec une solution de H_2O_2 à 3% dans du PBS, puis rincées 3 fois 5 min. dans du PBS. Les lames sont successivement traitées pendant 10 min. par des solutions de glycine 0,1 M dans du PBS et de Triton X-100, 0,3 % également dans du PBS avant d'être incubées pendant 2 heures à 37°C dans le tampon de préhybridation (50 % de formamide désionisé, SSC 4x, solution de Denhardt 1x, 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon, 0,125 mg/ml d'ARN de transfert et 0,8 % de sarcosyle).

Marquage de l'oligonucléotide à la digoxygénine.

On utilise 100 pm d'un oligonucléotide synthétique de 40 nucléotides (SEQ ID NO:16 ou 17) et marqués par la Dig-11-dUTP à l'extrémité 3', à l'aide de la trousse Boehringer Mannheim (Dig Oligonucléotides Tailing Kit. Réf. 1417231). Le marquage des sondes est contrôlé à l'aide d'un anticorps anti-digoxigénine, couplé à la phosphatase alcaline (révélation par une solution de NBT-BCIP).

Conditions d'hybridation et révélation des hybrides.

Sur chaque lame comprenant des lymphocytes fixés, ont été déposés 100 µl de solution d'hybridation composée de 4 pmoles de sonde marquée pour 96 µl de tampon de préhybridation. L'hybridation est réalisée à 37°C pendant 16 heures.

La révélation a été réalisée à l'aide de la trousse TSA™ Direct (kit NEN Réf. NEL 731). Après hybridation, les lames sont lavées successivement 3 fois pendant 10 min. dans du tampon SSC2X, SSC1X, SSC0,5X à température ambiante, puis 3 fois pendant 5 min. dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween-20 0,05 % (TNT). Les cellules sont ensuite incubées avec un tampon de blocage composé de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,15 M et 0,5 % de réactif bloquant pendant 30 min. Après blocage, l'immunodétection est réalisée pendant 90 min. avec un anticorps anti-digoxygénine couplé à la peroxydase (Boehringer Mannheim, Ref 1207733). L'anticorps est utilisé à une dilution au 1/100 dans le tampon de blocage de la trousse d'hybridation (TSA™ Direct). L'incubation est suivie de 3 rinçages de 5 min. dans le tampon TNT puis la peroxydase est détectée par action de la tyramide couplée à la fluorescéine pendant 5 min. comme décrit par le fournisseur (TSA™ Direct, NEN). Après 3 lavages de 5 min. dans le TNT, les cellules sont colorées avec une solution de 10⁻³ µg/ml de 4',6-diamidino-2 phénylindole (DAPI) pendant 10 min. Les lames sont ensuite rincées dans le tampon TNT avant d'être montées à l'aide du Vectasheild®, un produit de montage protecteur de la fluorescence (Vector Laboratories, ref: H-1000). La fluorescéine est observée à 525 nm et le DAPI à 425 nm avec un microscope AXIOPHOTE 2 de Carl ZEISS équipé pour l'immunofluorescence indirecte et avec une caméra refroidie, comme précisé ci-dessus.

*Détection de l'ARN messager du gène MmKin17 par hybridation
in situ dans les testicules de souris.*

Les testicules sont prélevés et inclus immédiatement à -20°C dans le milieu d'inclusion OCT (OCT compound, Tissue-Tek, Miles. Réf. 4583). Des coupes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat à -20°C. Elles ont été utilisées immédiatement ou congelées et gardées à -80°C jusqu'à utilisation. La première étape est la fixation au paraformaldéhyde 4 %, puis le protocole est identique à celui décrit ci-dessus, pour la détection du gène humain dans les lymphocytes T. Les sondes utilisées

pour la souris sont les oligonucléotides synthétiques : sonde anti-sens = 5'-CCA GGC CTC TTC TCA CCT GCT CCT CAA TGA ACT TGG CAG T-3' (SEQ ID NO:17) et sonde sens : 5'-ACT GCC AAG TTC ATT GAG GAG CAG GTG AGA AGA GGC CTG G-3' (SEQ ID NO:16). On observe une hybridation spécifique au niveau des 5 spermatocytes zygotènes (Figure 4).

Détection de l'ARN messager du gène HSkin17 par hybridation des ARN immobilisés sur membrane avec une sonde d'ADN radiomarquée.

La quantité de transcrit *Kin17* présent dans différents tissus est déterminée par la méthode de Northern (électrophorèse, transfert et hybridation des 10 ARNs). On utilise des membranes de Nylon sur lesquelles 2 µg d'ARN poly A+ de différents tissus humains sont transférés (coeur, cerveau, placenta, poumon, foie, muscle squelettique, rein, pancréas, rate, thymus, prostate, testicule, ovaire, petit intestin, colon et lymphocyte du sang périphérique, MTN, Clontech). La préhybridation et l'hybridation sont effectuées dans un four (*hybridization oven/shaker* d'Amersham). La 15 membrane est placée dans des tubes et incubée à 42°C pendant 5 heures avec 15 ml de solution d'hybridation (50 % formamide, 5 X SSPE, 5 X Denhardt's solution, 0,5 % SDS) en présence de 50 µg/ml final d'ADN de sperme de hareng soniqué (préalablement dénaturé à 100°C pendant 10 min. puis placé dans la glace). La membrane est ensuite incubée dans la solution d'hybridation dans laquelle la sonde- 20 1000 radiomarquée (SEQ ID NO:4) (préalablement dénaturée à 100°C pendant 10 min) a été ajoutée. L'incubation est réalisée pendant 16 heures à 42°C. Pour éliminer l'excès de sonde, la membrane est lavée deux fois 20 min., à température ambiante dans du 2 X SSC, 0,1 % SDS, deux fois 15 min., à 42°C dans du 0,5 X SSC, 0,1 % SDS puis une fois 15 min., à 60°C dans du 0,1X SSC, 0,1 % SDS. Les filtres sont 25 ensuite mis en contact avec des films X-OMAT AR (Kodak) ou Hyperfilm-MP (Amersham) à -80°C pendant 60-100 heures. Le panneau A de la Figure 3 montre l'autoradiographie obtenue après hybridation des ARN totaux extraits de différents tissus humains avec la Sonde-1000. Il existe une expression préférentielle du gène HSkin17 dans certains tissus comme le testicule, l'ovaire, le cœur, le muscle squelet- 30 tique ou le petit intestin alors qu'il est pratiquement indécelable dans d'autre tissus comme le rein, le poumon ou le cerveau.

EXEMPLE 4 : Détection de l'ARN *HSKin17* dans des lignées tumorales humaines.

Le taux d'ARN messager *HSKin17* dans différentes cellules dérivées des tumeurs humaines (leucémie promyélocyttaire (HL60), adénocarcinome de la glande cervicale (HeLa S3), leucémie myéloïde chronique (K-562), leucémie lymphoblastique (MOLT-4), lymphome de Burkitt Raji, adénocarcinome colorectal (SW480), carcinome du poumon (A549, mélanome (G361)) a été déterminé. Le protocole de détection du transcrit *HSKin17* utilisé est le même que celui décrit pour la détection de l'ARN *Kin17* dans les tissus humains (voir exemple 3). On utilise une membrane sur laquelle 2 µg d'ARN poly A+ de différentes cellules tumorales ont été immobilisés (MTN, Clontech). Le panneau B de la Figure 3 représente l'autoradiographie obtenue après hybridation de la sonde-1000 avec les ARN totaux extraits de différents cellules tumorales humaines. Après quantification des signaux obtenus pour l'ARN *HSKin17* par rapport à ceux calculé pour l'ARN d'actine, on constate que l'expression du gène *HSKin17* est très variable suivant la lignée : on observe une expression très faible dans les cellules HL60, alors qu'on observe une différence d'un facteur 15 dans les cellules K-562 ou d'un facteur 10 dans les cellules dérivées de l'adénocarcinome colorectal. Les cellules tumorales semblent donc réguler différemment l'expression du gène *HSKin17*.

EXEMPLE 5 : Etude de la surexpression transitoire de la protéine *kin17* de souris (_{Mm}*kin17*) et de ses formes tronquées dans des cellules humaines.

On a observé que les fibroblastes BALB/c 3T3 lorsqu'ils sont stimulés à proliférer présentent une accumulation intranucléaire de la protéine _{Mm}*kin17* dans les cellules en phase S (réplication de l'ADN). Pour mieux cerner le rôle de la protéine *kin17* sur la prolifération cellulaire, on a testé l'effet d'une surexpression de la protéine _{Mm}*kin17* sur la prolifération cellulaire. Un système de transfection transitoire, qui permet de surexprimer la protéine _{Mm}*kin17* dans les cellules de mammifères en culture, a été utilisé. Les vecteurs obtenus expriment bien la protéine _{Mm}*kin17* (vérification par des techniques d'immunofluorescence indirecte à l'aide des anticorps

polyclonaux pAb2064 dirigés contre la protéine *Mmkin17* (Biard et al., Arch. Dermatol., 1997, précité et Brevet français n° 2 706 487).

On observe l'effet de la surexpression transitoire de différentes formes tronquées de la protéine *kin17* sur la prolifération cellulaire.

5 *Construction des vecteurs d'expression eucaryotes.*

Tous les plasmides utilisés pour cette étude ont été construits à partir du vecteur pCMVDT21 qui permet une expression élevée du transgène (Bourdon et al., 1997). La phase ouverte de lecture de l'ADNc *Kin17* de souris (Angulo et al., 1991, N.A.R., précité) est insérée dans le vecteur pCMVDT21 digéré par l'enzyme de restriction *XhoI* pour obtenir le plasmide pCMVKin17. On utilise aussi l'ADNc appelé 10 *MmKin17ΔCT*. Il correspond à une délétion du fragment compris entre le nucléotide 854 et le nucléotide 1034 de l'ADNc *MmKin17*, et a déjà été décrit (Mazin et al., 1994, précité). Cet ADNc code pour une protéine tronquée dans sa région C-terminale, nommée protéine *kin17ΔCT* (délétée dans la région C-terminale), qui a un poids 15 moléculaire de 32407 Daltons. Cet ADNc *Kin17ΔCT* est inséré dans le vecteur pCMVDT21 ; on obtient ainsi le plasmide pCMVKin17ΔCT. Un deuxième mutant est obtenu en délétant l'ADNc *MmKin17* du nucléotide 412 au nucléotide 705. Un tel 20 acide nucléique code pour une protéine tronquée (absence de 99 amino-acides entre les résidus 129 et 228), au niveau d'une région contenant la séquence homologue à la protéine RecA. Cette protéine mutée a été nommée *Mmkin17ΔRH* (délétée dans la Région Homologue). L'ADNc *MmKin17ΔRH* est généré de la façon suivante :

a) Amplification par PCR de la région 5' de l'ADNc *MmKin17* (entre les nucléotides 1 à 411) à partir du vecteur pcD2Kin17 (Angulo et al., 1991) en utilisant le couple d'oligonucléotides :
25 5'-AAGCTGCTGCAGCAGCTTATCGGG-3' (SEQ ID NO:29) et
5'-GGTACCTTTACACAAGCCCTCTGCC-3' (SEQ ID NO:30).

b) Amplification par PCR de la région 3' de l'ADNc *MmKin17* (entre les nucléotides 706-1352) en utilisant les amores :
30 5'-GGTACCACTGCACTGAAGCTGCTGGGG-3' (SEQ ID NO:31) et
5'-ATTTACCCAACATTCACTA-3' (SEQ ID NO:32).

Les deux produits d'amplification sont ensuite liés entre eux au site *KpnI* (séquence soulignée). Le séquençage de la jonction des deux fragments a montré que le cadre de lecture de la protéine kin17 est intacte. L'ADN ainsi obtenu est inséré dans le vecteur pCMVDT21 pour donner le plasmide pCMVKin17ΔRH.

5 La Figure 5 montre la représentation schématique des différentes protéines exprimées. La séquence des acides aminés est représentée de façon linéaire. Le nom des protéines est indiqué à gauche de chaque protéine et la taille est mentionnée à droite. La Région Homologue à la protéine RecA (RH, aa 163 à 201) et le Signal de Localisation Nucléaire (SLN, aa 235 à 285) sont présentés dans des rectangles 10 hachurés. Les résidus délétés sont numérotés en fonction de leur position respective dans la séquence de la protéine kin17 et sont indiqués comme des discontinuités.

Transfection transitoire de vecteurs d'expression dans les cellules humaines.

Les différentes constructions ont été transfectées dans des cellules 15 HeLa, qui sont des cellules humaines issues d'un adénocarcinome de la glande cervicale (référence ATCC CCL-2). On obtient 10 % de cellules transfectées. La transfection s'effectue de la façon suivante : les cellules HeLa sont ensemencées dans des boîtes de 35 mm de diamètre dans lesquelles une lamelle de verre a préalablement été déposée. Les cellules sont incubées dans un milieu DMEM contenant 4,5 g/l de 20 glucose, 10 % de sérum de veau foetal et 1 % de pénicilline-streptomycine à une densité de 2×10^5 cellules par boîte. 24 heures plus tard, les cellules sont incubées avec le mélange suivant : pour chaque transfection, on mélange 3 µg d'ADN à 10 µl de CaCl_2 2,5 M dans un volume final de 100 µl. Le précipité est homogénéisé et additionné goutte à goutte à 100 µl de tampon de transfection (274 mM NaCl ; 1 mM 25 KCl ; 1,5 mM Na_2HPO_4 , 12 H_2O ; 11 mM D(+) Glucose ; 25 mM HEPES ; ajusté à pH 7,15 et stérilisé par filtration). Le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante puis déposé goutte à goutte sur les cellules. L'incubation dure 16 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS, puis remises dans du milieu DMEM contenant 10 % de SVF et 1 % de pénicilline-streptomycine 30 pendant 24 heures à 37°C. Les cellules humaines transfectées sont fixées avec une solution de méthanol/acétone (3v/7v) à -20°C pendant 10 min., puis séchées à tempé-

rature ambiante pendant 10 min., afin d'analyser par immunofluorescence indirecte la localisation de la protéine $Mmkin17$ surproduite.

Détection de la protéine kin17 par immunofluorescence indirecte.

5 Les cellules fixées sont réhydratées 10 min. dans du PBS, puis incubées en chambre humide 1h30 à 37°C avec l'anticorps pAb2064 dilué au 1/100 dans du PBS en présence de 3 % BSA. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS à température ambiante et sous agitation, les cellules sont incubées avec le deuxième anticorps 10 anti-immunoglobulines de lapin produit chez la chèvre, couplé au fluorochrome CyTM 2 (Jackson Immuno Research Laboratories), dilué au 1/500, pendant 45 minutes à 37°C et dans l'obscurité. Les lamelles sont ensuite lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS et incubées dans une solution de 10^{-3} µg/ml de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pendant 5 min. Les lamelles sont ensuite rincées à l'eau avant d'être collées sur une lame avec un produit de montage (Glycergel, Dako).

15 La Figure 6 correspond à une photographie des cellules HeLa transfectées par le plasmide pCMVKin17 contenant l'ADNc $MmKin17$ sous le contrôle du promoteur du cytomégavirus. Le marquage de l'ADN par le DAPI permet de distinguer, colorés en bleu, les noyaux des cellules. La coloration intranucléaire verte correspond au marquage indirect de la protéine $Mmkin17$ surproduite dans les cellules 20 transfectées.

La protéine $Mmkin17$ est localisée essentiellement dans des foyers intranucléaires discrets.

On a détecté des cellules qui expriment un taux faible de protéine $Mmkin17$. La localisation est clairement nucléaire et on observe une concentration de la protéine $Mmkin17$ dans des foyers intranucléaires d'un diamètre d'environ 0,5 µm (Figure 7 A). Lorsque la protéine kin17 est exprimée en grande quantité, elle forme des foyers intranucléaires plus gros, avec des dimensions similaires, voire plus grandes que les nucléoles (Figure 7B). Ce résultat montre que la protéine kin17 produite par le vecteur pCMVKin17 s'exprime, que les anticorps pAb2064 reconnaissent sa forme native et qu'elle présente une localisation nucléaire. Ces résultats 30

confirment qu'*in vivo*, le signal de localisation nucléaire est bien fonctionnel. La localisation de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}$ dans des foyers intranucléaires discrets semble refléter la compartmentalisation fonctionnelle des processus biologiques qui ont lieu dans le noyau. En effet, des profils similaires ont déjà été observés pour d'autres protéines impliquées, soit dans le complexe multiprotéique de réplication, soit dans le complexe de transcription ou encore pour des protéines intervenant dans l'épissage alternatif des ARNm.

La surexpression de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ conduit à la formation d'aggrégats intranucléaires.

Le vecteur pCMVKin17 ΔRH est transfété dans les cellules humaines dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. La détection de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ par la méthode d'immunofluorescence indirecte est réalisée soit en utilisant l'anticorps anti-kin17 (pAb2064) ou l'anticorps anti-RecA (Brevet français n° 2 706 487, Angulo et al., Biochimie, 1991, précité). On observe que l'anticorps pAbanti-RecA est incapable de détecter la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ (Figure 8, panneaux A : cellules HeLa transfectées par le plasmide pCMVKin17 ΔRH et traitées pour l'immunodétection avec l'anticorps pAbanti-RecA). Ceci démontre que la région homologue à la protéine RecA est effectivement responsable de la réactivité croisée entre la protéine kin17 et les anticorps pAbanti-RecA. En revanche, la protéine kin17 ΔRH est facilement détectée en utilisant l'anticorps pAb2064 (Figure 8, panneaux B : cellules HeLa transfectées par le plasmide pCMVKin17 ΔRH et traitées pour l'immunodétection avec l'anticorps pAb2064). On observe une coloration verte nucléaire correspondant au marquage indirect de la protéine kin17 ΔRH surproduite dans les cellules transfectées. Les noyaux des cellules sont colorés avec le DAPI. La distribution de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ est différente de celle de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}$. En effet, la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ forme de larges aggrégats intranucléaires dans toutes les cellules transfectées indépendamment de la quantité de protéine surproduite. Ceci pourrait indiquer que la délétion des amino-acides entre 129 et 228 augmente la liaison de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ à un autre composant nucléaire comme l'ADN ou

la chromatine. D'autres approches biochimiques ont montré que la solubilité de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ est différente de celle de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}$.

La présence de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ produit des déformations de la morphologie nucléaire (DMN) des cellules HeLa.

On transfète des cellules HeLa avec le plasmide pCMVKin17 Δ RH, puis on détecte par immunofluorescence indirecte les cellules exprimant la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$. L'analyse par microscopie en contraste de phase montre que 100 % des cellules transfectées présentent des altérations de la morphologie nucléaire (Figure 8, contraste de phase). Lorsque les cellules surproduisent la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{CT}$ il est impossible de détecter ce type de DMN (Figure 9). Dans le cas de la production des faibles quantités de protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}$, on observe la formation de foyers intranucléaires et les cellules présentent une morphologie nucléaire normale sans altérations (comme décrit plus haut). Par contre, la surexpression d'une quantité importante de protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}$ mène à la formation de très gros foyers intranucléaires qui ressemblent à la distribution de la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ et dans ce cas, les cellules présentent systématiquement des DMN (Figure 7). Le fait que 100 % des cellules qui expriment la protéine $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ ont des altérations de la morphologie nucléaire indique le phénotype dominant de ce mutant.

Les DMN sont corrélées à une inhibition de la réplication de l'ADN.

On démontre que l'expression des protéines $M_{m\text{m}}\text{kin17}$ et $M_{m\text{m}}\text{kin17}\Delta\text{RH}$ produisent des DMN et affectent des processus biologiques nucléaires comme la réplication. Un résumé des résultats est présenté à la figure 10. L'ADNc $M_{m\text{m}}\text{Kin17}\Delta\text{RH}$ est introduit dans des cellules humaines HeLa. Après expression du plasmide, la protéine kin17 est détectée par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps marqué à la rhodamine (coloration rouge). En parallèle, dans les mêmes cellules, on détecte le taux de réplication de l'ADN par l'incorporation de BrdU (coloration verte) ; l'ADN génomique contenu dans les noyaux est visualisé par le

DAPI (coloration bleue) (figure 10). La surexpression de la protéine $Mmkin17\Delta RH$ inhibe complètement l'incorporation du BrdU (figure 10).

Test de clonogénéicité des cellules surexprimant la protéine kin17 ou ses formes mutées.

5 Les plasmides pCMVDT21, pCMVKin17, pCMVKin17 ΔRH ou pCMVKin17 ΔCT ont été cotransférés avec le plasmide pEGFP-N1 (Clontech) dans des cellules HeLa, qui sont ensuite incubées pendant 20 jours dans un milieu contenant un marqueur de sélection (génétidine). Les colonies formées sont comptées. Le nombre de colonies formées par les cellules transférées avec le plasmide pCMVDT21
10 est considéré comme 100 %.

La protéine kin17 permet la formation de 10 % de colonies. La protéine kin17 ΔRH permet la formation de 20 % de colonies.

La protéine kin17 ΔCT permet la formation de 70 % de colonies.

15 La présence de la protéine kin17 ou kin17 ΔRH affecte considérablement la croissance des cellules, alors que la protéine kin17 ΔCT n'a pas d'action inhibitrice sur la prolifération cellulaire.

Effets de la surproduction de la protéine kin17 ΔCT et rôle du fragment C-terminal.

- Construction des vecteurs exprimant des protéines de fusion.

20 Les plasmides utilisés pour cette étude ont été construits à partir du vecteur pEGFP-C3 qui exprime la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*, Clontech). Il a été inséré en phase de l'ADNc qui code pour la GFP, l'ADNc appelé MmKin17 ΔCT . On obtient ainsi le plasmide pEGFP-Kin17 ΔCT qui exprime la protéine de fusion GFP-kin17 ΔCT qui a un poids moléculaire de 60 kDa. Une
25 deuxième protéine de fusion a été créée en insérant en phase de l'ADNc qui code pour la GFP, l'ADNc appelé MmKin17SLN-CT qui code pour le signal de localisation nucléaire ainsi que pour la partie C-terminale de la protéine kin17, nommée protéine kin17SLN-CT. On obtient ainsi le plasmide pEGFP-Kin17SLN-CT qui exprime la protéine de fusion GFP-kin17SLN-CT qui a un poids moléculaire de 46 kDa.

- Résultats :

La détection de la protéine kin17 Δ CT par immunofluorescence indirecte montre que cette protéine tronquée a plutôt une distribution nucléaire homogène avec une forte réduction du nombre de foyers intranucléaires. D'autre part, la surproduction de cette protéine kin17 Δ CT ne génère jamais de déformation intranucléaire. De plus, sa présence dans les cellules n'affecte ni la réPLICATION de l'ADN ni la prolifération cellulaire. Ces différents résultats montrent que la région peptidique responsable de la formation des foyers intranucléaires, des altérations de la morphologie nucléaire et de l'inhibition de la prolifération cellulaire semble être la région C-terminale.

Pour vérifier cette hypothèse, la localisation subcellulaire des protéines de fusion GFP-kin17 Δ CT (délétée dans la région C-terminale) et GFP-kin17SLN-CT (possède le SLN et la région C-terminale de la protéine kin17) a été déterminée.

La figure 18 montre la détection, *in vivo*, de ces deux protéines dans les cellules HeLa : alors que la protéine de fusion GFP-kin17 Δ CT présente une localisation nucléaire diffuse, la protéine GFP-kin17SLN-CT montre essentiellement une localisation sous forme de foyers nucléaires similaires à ceux formés par la protéine kin17. Ainsi, ces observations démontrent que la région C-terminale de la protéine kin17 est capable de diriger une protéine hétérologue (la GFP) dans les foyers intranucléaires et suggèrent fortement que c'est cette région qui est responsable des effets cytotoxiques observés lors de la surproduction de la protéine kin17.

EXAMPLE 6 : Obtention des cellules humaines qui ont une expression stable de la protéine M_m kin17. Effet sur la prolifération cellulaire.

Pour confirmer les effets produits par l'expression transitoire de la protéine M_m kin17, on a cherché à isoler des cellules qui expriment en continu la protéine M_m kin17 et à déterminer l'effet de cette expression ectopique sur la survie cellulaire, la prolifération et la morphologie des cellules. On a utilisé l'ADN complémentaire *MmKin17* de souris porté par des vecteurs navettes "EBV" afin de transfecter des cellules humaines en culture, appelées HEK 293 ("Transformed

5 *human embryo kidney cells* "HEK- Ad5), établies à partir de reins embryonnaires transformés par des fragments de l'Adénovirus 5 (Graham F.L. et al., *J. Gen. Virol.*, 1977, **36**, 59-72). On cherche à sélectionner des cellules capables d'exprimer la protéine Mm kin17. On a supposé que la surproduction de la protéine kin17 de souris dans les cellules humaines a un effet biologique très proche de la protéine humaine étant donné la conservation des séquences observée entre l'homme et la souris (figure 2A et 2B).

Les vecteurs d'expression EBV portant l'ADNc Mm Kin17.

10 L'ADNc Mm Kin17 est introduit dans des vecteurs d'expression dérivés du virus d'Epstein Barr (vecteurs EBV) sous le contrôle d'un promoteur viral très puissant ("human cytomegalovirus immediate-early promoter" ou "IE HCMV") ou d'un promoteur inducible par les métaux lourds (promoteur de souris mMT-I du gène de la métallothionéine I). Ces plasmides sont dérivés de ceux déjà publiés (Biard et al., *Biochim. BioPhys. Acta*, 1992, **1130**, 68-74 ; Biard et al, *Exp. Cell Res.*, 1992, **200**, 15 263-271). Ces vecteurs ont les avantages suivants : 1) se maintiennent de façon épisomale (extrachromosomique) stable dans les cellules humaines ; 2) persistent en nombre faible de copies par cellule (1 à 20 dans les lignées établies) ; 3) se répliquent une fois par cycle cellulaire ; 4) se ségrègent entre les cellules filles comme les chromosomes ; 5) présentent un bruit de fond de mutagenèse spontanée extrêmement faible 6) ne perturbent pas l'intégrité fonctionnelle des cellules transfectées ; 7) permettent la sélection des cellules qui les portent par le fait de conférer la résistance à l'hygromycine ou à la généticine (G418).

20 Les étapes de clonage dans les vecteurs EBV et d'analyse de ces vecteurs ont déjà été décrites (Biard et al., *Biochim. BioPhys. Acta*, 1992 ; Biard et al, *Exp. Cell Res.*, 1992, précités). Parmi les plasmides construits, 4 d'entre eux ont plus particulièrement été étudiés : le vecteur pEBVMT Mm Kin17 (ou pB223) (figure 11), le vecteur pEBVMT Δ (ou pB220) (figure 11), le vecteur pEBVCMV Mm Kin17 (ou pB291) et le vecteur pEBVCMVAS Mm Kin17 (ou pB291AS dans lequel l'ADNc Mm Kin17 a été inséré en position "anti-sens"). Après le clonage, les vecteurs sont 30 amplifiés dans la bactérie DH5 et purifiés sur des colonnes "Qiagen" selon les recom-

mandations du fournisseur. Cet ADN est alors utilisé pour transfecter les cellules humaines.

La transfection des cellules humaines.

Les cellules d'eucaryotes ont été cultivées dans des boîtes 6-puits 5 contenant 2 ml de milieu par puits. Par la suite, 1 à 2 µg d'ADN par puits sont transfectés (selon le type cellulaire) par précipitation avec du chlorure de calcium (Biard et al., *Biochim. BioPhys. Acta*, 1992 ; Biard et al, *Exp. Cell Res.*, 1992, précités). Les cellules sont incubées à 37°C toute la nuit et le milieu est remplacé par du milieu frais sans antibiotique. 48 heures après la transfection, les protéines cellulaires sont analysées 10 par la technique de "Western blot" ou d'immunohistochimie comme décrit précédemment (Biard et al, *Rad. Res.*, 1997; Biard et al, *Arch. Dermatol. Res.*, 1997). La purification des plasmides par la technique de "Hirt" permet leur caractérisation par hybridation ADN-ADN ou par transformation des bactéries DH5 α et amplification 15 (Biard et al, *Exp. Cell Res.*, 1992, précité). Les cultures cellulaires sont poursuivies en présence de 250 µg/ml d'hygromycine dans le milieu pendant 4 jours, puis avec 125 µg/ml d'hygromycine ou de généticine (750 µg/ml pendant 4 jours, puis 250 µg/ml), afin de déterminer la croissance clonogénique et d'établir des lignées continues.

Effet de la surexpression de la protéine $MmKin17$ dans des cellules 20 tumorales H1299.

Les cellules H1299 (ATCC CRL-5803) sont des cellules épithéliales humaines du poumon qui ont été établies après prélèvement d'un patient atteint d'un carcinome pulmonaire NSCLC ("non small cell lung cancer"). Ces cellules tumorales présentent une inactivation du gène *p53*. L'expression de l'ADNc *MmKin17* sous le 25 contrôle du promoteur puissant IE HCMV entraîne une diminution très importante du nombre de colonies formées 14 jours après la transfection et cela en présence du marqueur de sélection (hygromycine ou généticine). Dans les mêmes conditions, l'expression de l'ADNc *MmKin17* anti-sens permet l'établissement de très nombreux clones. De ce fait, il ressort qu'une expression ectopique de la protéine $Mmkin17$ dans 30 les cellules tumorales H1299 entraîne un désavantage sélectif important. Il est donc

très difficile, voire impossible d'établir des lignées dérivées des cellules H1299 exprimant en continu la protéine M_{mkin17} .

Obtention des cellules HEK 293 immortelles qui surexpriment la protéine M_{mkin17} .

5 Ces cellules HEK 293 présentent les caractéristiques suivantes: 1) sur 4 à 5 fragments du génome viral, intégrés dans leur génome (12 % de l'extrémité gauche et une copie de 9 % de l'extrémité droite) (Aiello L. et al., *Virology*, 1979, **94**, 460-469), seuls les transcrits de l'extrémité gauche sont détectés ; 2) caractère transformé et perte de l'inhibition de contact ; 3) sécrètent leurs propres facteurs de croissance et donc poussent en milieu faible en sérum ; 4) tumorigénicité modérée (15 % des souris *nudes* présentant des tumeurs) ; 5) efficacité de transfection supérieure à 10 30 %. (observée 48 h après la transfection d'un vecteur pEBVCMVlacZ ou d'un vecteur pEBVCMVEGFP).

On observe que 48h après la transfection du vecteur 15 pEBVCMV M_{mkin17} , un grand nombre de cellules expriment la protéine M_{mkin17} à un niveau très élevé. Après sélection à l'hygromycine (250 µg/ml), on observe dans tous les cas un nombre très important de clones, ce nombre étant toujours plus important que celui observé après transfection du vecteur contrôle pEBVCMVAS M_{mkin17} . Ainsi, 14 jours après la sélection, la viabilité des cellules est compatible avec 20 l'expression de la protéine M_{mkin17} . Après plusieurs semaines, on constate une perte progressive du nombre de cellules exprimant la protéine M_{mkin17} . Ceci se reproduit dans de nombreuses expériences de transfection. Cela indique que l'expression ectopique de la protéine M_{mkin17} entraîne un désavantage sélectif des cellules HEK 293, qui entraîne leur disparition. En revanche, les cellules HEK 293 transfectées par 25 d'autres vecteurs EBV, comme les vecteurs pEBVCMVlacZ, pEBVMTlacZ, ou pEBVCMVlacI maintiennent une expression stable du gène d'intérêt (ici les gènes bactériens *lacZ* ou *lacI*) pendant de nombreux mois, voire de nombreuses années (Biard et al., *Cancer Res.*, 1992, précité).

On transfec te des cellules HEK 293 avec le vecteur pEBVMT_{Mm}Kin17. Dans ce vecteur, l'expression de l'ADNc *MmKin17* est contrôlée par le promoteur mMT-I. De ce fait, l'expression basale de l'ADNc *MmKin17* est considérablement plus faible que celle obtenue avec le promoteur IE HCMV. De plus, 5 l'expression peut être augmentée par l'utilisation de métaux lourds dans le milieu de culture. On a isolé et analysé plusieurs clones stables qui expriment un taux très faible de protéine *Mmkin17*. L'avantage de ce système est que l'introduction de 100 µM de Zn et 1 µM de Cd dans le milieu de culture active le promoteur mMT-I et augmente l'expression de l'ADNc *MmKin17* (figure 12).

10 Un clone, dénommé cellules B223.1 (figure 12), puisqu'il porte le vecteur pEBVMT_{Mm}Kin17 (ou pB223), présente une expression basale assez élevée de la protéine *Mmkin17*, alors que le clone dénommé pB223.2 présente une expression basale basse de la protéine *Mmkin17*. La caractérisation de ce clone pendant plus de 8 mois en culture continue a montré que le taux de la protéine *Mmkin17* est corrélé avec 15 une diminution très importante de la prolifération cellulaire.

La protéine *Mmkin17* est détectée dans les cellules transfectées par coloration immunocytochimique ; alors que l'on n'observe aucun signal avec les cellules B220 (figure 12C et D), un signal intense est détecté dans toutes les cellules B223.1, 24 heures après un traitement aux métaux lourds avec un anticorps anti-recA 20 (figure 12A et 12B).

On observe également des différences d'expression dans la population de cellules B223.1.

En utilisant la microscopie conventionnelle avec un filtre étroit pour analyser l'émission du fluorochrome Cy2™, on observe moins de 1 % de cellules 25 B223.1 surexprimant la protéine *Mmkin17*, en l'absence de stimulation avec les métaux lourds (figure 13A) ; après stimulation aux métaux lourds, on détecte un fort signal spécifique, localisé dans les noyaux des cellules B223.1 (figure 13B).

Dans ces conditions expérimentales, la protéine endogène *HSkin17* n'est pas détectable (figure 12C et 13C).

On observe également une diminution de la croissance clonogénique des cellules B223.1, une incapacité à pousser à faible densité, et une mauvaise adhérence au support de culture (figure 13B). Les cellules B223.1 sont souvent géantes et polynucléées (figure 14). On observe plus de cellules polynucléées dans la population 5 de cellules B223.1 que dans les deux autres lignées cellulaires (B220 et B223.2) (figure 15). Elles présentent des structures nucléaires multilobées ainsi que des micro- noyaux. Ces résultats indiquent que la viabilité des cellules humaines HEK 293 est compatible avec une expression constitutive faible de la protéine _{Mm}kin17. En revanche, un taux d'expression élevé affecte négativement la prolifération cellulaire. 10 Ces résultats indiquent que la surexpression de la protéine _{Mm}kin17 compromet la viabilité cellulaire. Tous ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle la protéine _{Mm}kin17 devrait intervenir dans le contrôle (négatif) de la prolifération cellulaire (figure 16).

Lorsque les cellules B223.1 sont ensemencées à une densité de 10³ 15 cellules/cm², on observe qu'en l'absence de métaux lourds, ces cellules sont incapables de croître après 7 jours en culture ; elles restent rondes et ne s'étalent pas (figure 12 et 17A). Alors que les cellules B223.1 commencent à croître après 7 jours en culture, les deux autres lignées cellulaires arrivent presque à confluence (figure 17A). Lorsque ces différentes lignées cellulaires sont mises en croissance à différentes 20 densités pour tenir compte de leur efficacité à former des plaques, on observe un taux de prolifération réduit des cellules B223.1, en comparaison avec les deux autres lignées (figure 17B). Dans la mesure où l'on n'observe aucune différence en présence ou en l'absence d'hygromycine, B, on doit considérer que ces résultats ne sont pas dus à une différence de sensibilité au milieu de sélection (figure 17B).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite 25 nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO:1 et en ce qu'elle est apte à exprimer une protéine kin17 humaine fonctionnelle.

5 2°) Séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine kin17 tronquée au niveau d'une région homologue à la protéine recA.

3°) Séquence d'acide nucléique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine kin17 tronquée qui correspond à une protéine kin17, dans laquelle au moins le fragment compris entre les aminoacides 162 et 201 et 10 au plus le fragment compris entre les aminoacides 55-235 est déleté.

4°) Séquence selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite séquence d'acide nucléique code pour une protéine kin17 tronquée qui correspond à la protéine kin17 de souris dans laquelle le fragment compris entre les aminoacides 129-228 est déleté et en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO:2.

15 5°) Séquence selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite séquence d'acide nucléique code pour une protéine kin17 tronquée qui correspond à la protéine kin17 humaine dans laquelle le fragment 129-228 est déleté et en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO:3.

20 6°) Fragments de la séquence SEQ ID NO:1, pour la détection du gène codant pour la protéine kin17 humaine et/ou de l'ARN du gène *Kin17* dans un échantillon biologique.

7°) Fragments selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:4-21 et 33.

25 8°) Procédé de détection de l'ADN génomique ou d'un produit de transcription du gène humain *Kin17*, par hybridation et/ou amplification génique, réalisé à partir d'un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

30 (1) une étape au cours de laquelle l'on met en contact un échantillon biologique à analyser avec au moins une sonde sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1-21 et 33 et

(2) une étape au cours de laquelle on détecte par tout moyen approprié le ou les produits résultant de l'interaction séquence nucléotidique-sonde.

9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la sonde de l'étape (1) est éventuellement marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

10°) Procédé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que ladite sonde est constituée par la séquence SEQ ID NO:4.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il peut comprendre, préalablement à l'étape (1) :

10 . une étape d'extraction de l'acide nucléique à détecter, et
10 . au moins un cycle d'amplification génique réalisé à l'aide d'une paire d'amorces sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO:5-21, de préférence à l'aide de la paire d'amorces SEQ ID NO:16 et SEQ ID NO:17.

12°) Procédé de détection d'un produit de transcription du gène humain *Kin17*, caractérisé en ce qu'il comprend :

15 - une étape d'extraction de l'ARN à détecter,
15 - une étape de synthèse de l'ADNc correspondant audit ARN par transcription inverse en présence d'amorces aléatoires,
20 - au moins un cycle d'amplification génique réalisé à l'aide d'une paire d'amorces sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO:5-21, et
20 - la détection du produit amplifié.

13°) Procédé de détection selon la revendication 12, caractérisé en ce que ladite paire d'amorces est sélectionnée dans le groupe constitué par les paires suivantes : séquences SEQ ID NO:5 et SEQ ID NO :12, qui permettent d'amplifier un fragment de 453 pb ; séquences SEQ ID NO: 18 et SEQ ID NO:19, qui permettent d'amplifier un fragment de 1265 pb et séquences SEQ ID NO:16 et SEQ ID NO:7, qui permettent d'amplifier un fragment de 224 pb.

14°) Procédé de détection selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisé en ce que la détection est effectuée par électrophorèse sur gel et révélation convenable, suivi éventuellement d'une quantification.

15°) Protéine kin17 Δ RH, caractérisée en ce qu'elle correspond à une protéine kin17 tronquée au niveau d'une région homologue à la protéine recA.

16°) Protéine kin17 Δ RH selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle correspond à une protéine kin17 dans laquelle au moins le fragment compris 5 entre les aminoacides 162 et 201 et au plus le fragment compris entre les aminoacides 55-235 est déleté.

17°) Protéine kin17 Δ RH selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite protéine kin17 tronquée correspond à la protéine kin17 de souris dans laquelle le fragment compris entre les aminoacides 129-228 est déleté et présente la 10 séquence SEQ ID NO:22 (séquence dénommée _{Mm}kin17 Δ RH).

18°) Protéine kin17 Δ RH selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite protéine kin17 tronquée correspond à une protéine kin17 humaine dans laquelle le fragment 129-228 est déleté et présente la séquence SEQ ID NO:23 (séquence dénommée _{HS}kin17 Δ RH).

15 19°) Fragment d'une séquence d'acide nucléique codant pour un segment d'une protéine kin17 de mammifère, caractérisé en ce qu'il comprend entre 300 et 360 nucléotides codant pour la partie C-terminale d'une protéine kin17 de mammifère (SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :24) et est apte à contrôler la prolifération cellulaire.

20 20°) Fragment selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par la SEQ ID NO:33 et la SEQ ID NO:34.

21°) Fragment de protéine kin17, caractérisé en ce qu'il comprend entre 100 et 120 acides aminés, situés en position C-terminale de la séquence SEQ ID NO :25 ou de la séquence SEQ ID NO :26.

25 22°) Fragment selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par la SEQ ID NO:35 et la SEQ ID NO:36.

23°) Utilisation d'une protéine kin17 de mammifère ou d'un fragment de protéine selon l'une quelconque des revendications 21 et 22, pour la préparation d'un médicament contrôlant la prolifération cellulaire.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/02667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/47 A61K38/17 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	P. KANNOUCHE ET AL: "Overexpression of KIn17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells" BIOCHIMIE, vol. 79, no. 9-10, October 1997, pages 599-606, XP002076394 * whole document in particular pages 600 and 601	2-4, 15-17, 27
A		1, 6-14, 18-21, 23, 31 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 1999

Date of mailing of the international search report

03/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.
PCT/FR 98/02667

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 706 487 A (COMMISARIAT A L' ENERGIE ATOMIQUE) 23 December 1994 cited in the application see claims; figures 1,8; examples 1-3,7	1,6
A	see page 6, line 17 - page 7 see page 8, line 25 - line 33 see page 8, line 34 - page 9, line 30 see page 6, line 19 - page 7, line 36 see page 5, line 10 - line 20 see page 10, line 13 - page 11, line 10 ---	7-14, 31, 32
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Differential expression of the hSkin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin" ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 289, no. 8, July 1997, pages 448-456, XP002076395 cited in the application see abstract see page 455, left-hand column see page 453, right-hand column see page 451, right-hand column see page 449, left-hand column ---	1,15,23, 24
A	A. MAZIN ET AL: "kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 22, no. 20, 1994, pages 4335-4341, XP002076396 OXFORD - GB cited in the application see page 4336 see page 4337, right-hand column - page 4338, left-hand column ---	2-5, 15-18,31
X	M.D. ADAMS ET AL: "EST63674 jurkat T-cells V Homo sapiens cDNA5' end similar to zinc finger protein KIN17" EMBL DATABASE ENTRY HSZZ60420, ACCESSION NUMBER AA355283, 18 April 1997, XP002099852 see abstract & M.D. ADAMS ET AL: "initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence" NATURE., vol. 377, 1995, pages 3-174, LONDON - GB ---	6 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/02667

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.F. ANGULO ET AL: "Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 19, no. 19, 1991, pages 5117-5123, XP002076397 OXFORD GB cited in the application see the whole document ---	1,6,27
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation" RADIATION RESEARCH, vol. 147, no. 4, April 1997, pages 442-450, XP002076398 cited in the application see the whole document ---	7-14
A	J.F. ANGULO ET AL: "Identification of a mouse cDNA fragment whose expressed polypeptide reacts with anti-Reca antibodies" BIOCHIMIE, vol. 73, no. 2-3, March 1991, pages 251-256, XP002076423 cited in the application see page 255; figure 3 see page 254 ---	23,24
A	A. TISSIER ET AL: "Molecular cloning and characterization of the mouse Kin17 gene coding for a Zn-finger protein that preferentially recognizes Bent DNA" GENOMICS, vol. 38, no. 2, 1 December 1996, pages 238-242, XP002099853 cited in the application see the whole document ---	6,31
T	P. KANNOUCHE ET AL: "The nuclear concentration of Kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation" CARCINOGENESIS, vol. 19, no. 5, May 1998, pages 781-789, XP002076399 ---	1,6-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02667

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2706487 A	23-12-1994	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 98/02667

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 C12Q1/68

C07K14/47

A61K38/17

A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	P. KANNOUCHE ET AL: "Overexpression of KIn17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells" BIOCHIMIE, vol. 79, no. 9-10, octobre 1997, pages 599-606, XP002076394 * le document en entier plus particulièrement pages 600 et 601*	2-4, 15-17,27
A	----- -----	1,6-14, 18-21, 23,31
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/05/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Fax: +31 70 3402010, Tel: +31 70 3402020

Fonctionnaire autorisé

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem a Internationale No
PCT/FR 98/02667

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 706 487 A (COMMISARIAT A L' ENERGIE ATOMIQUE) 23 décembre 1994 cité dans la demande voir revendications; figures 1,8; exemples 1-3,7 voir page 6, ligne 17 - page 7 voir page 8, ligne 25 - ligne 33 voir page 8, ligne 34 - page 9, ligne 30 voir page 6, ligne 19 - page 7, ligne 36 voir page 5, ligne 10 - ligne 20 voir page 10, ligne 13 - page 11, ligne 10 ---	1,6
A	voir page 6, ligne 17 - page 7 voir page 8, ligne 25 - ligne 33 voir page 8, ligne 34 - page 9, ligne 30 voir page 6, ligne 19 - page 7, ligne 36 voir page 5, ligne 10 - ligne 20 voir page 10, ligne 13 - page 11, ligne 10 ---	7-14, 31, 32
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Differential expression of the hsKin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin" ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 289, no. 8, juillet 1997, pages 448-456, XP002076395 cité dans la demande voir abrégé voir page 455, colonne de gauche voir page 453, colonne de droite voir page 451, colonne de droite voir page 449, colonne de gauche ---	1,15,23, 24
A	A. MAZIN ET AL: "kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 22, no. 20, 1994, pages 4335-4341, XP002076396 OXFORD GB cité dans la demande voir page 4336 voir page 4337, colonne de droite - page 4338, colonne de gauche ---	2-5, 15-18,31
X	M.D. ADAMS ET AL: "EST63674 jurkat T-cells V Homo sapiens cDNA5' end similar to zinc finger protein KIN17" EMBL DATABASE ENTRY HSZZ60420, ACCESSION NUMBER AA355283, 18 avril 1997, XP002099852 voir abrégé & M.D. ADAMS ET AL: "initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence" NATURE., vol. 377, 1995, pages 3-174, LONDON GB ---	6

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 98/02667

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J.F. ANGULO ET AL: "Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 19, no. 19, 1991, pages 5117-5123, XP002076397 OXFORD GB cité dans la demande voir le document en entier ---	1,6,27
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation" RADIATION RESEARCH, vol. 147, no. 4, avril 1997, pages 442-450, XP002076398 cité dans la demande voir le document en entier ---	7-14
A	D.S.F. BIARD ET AL: "Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation" RADIATION RESEARCH, vol. 147, no. 4, avril 1997, pages 442-450, XP002076398 cité dans la demande voir le document en entier ---	23,24
A	J.F. ANGULO ET AL: "Identification of a mouse cDNA fragment whose expressed polypeptide reacts with anti-Reca antibodies" BIOCHIMIE, vol. 73, no. 2-3, mars 1991, pages 251-256, XP002076423 cité dans la demande voir page 255; figure 3 voir page 254 ---	6,31
A	A. TISSIER ET AL: "Molecular cloning and characterization of the mouse Kin17 gene coding for a Zn-finger protein that preferentially recognizes Bent DNA" GENOMICS, vol. 38, no. 2, 1 décembre 1996, pages 238-242, XP002099853 voir le document en entier ---	1,6-14
T	P. KANNOUCHE ET AL: "The nuclear concentration of Kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation" CARCINOGENESIS, vol. 19, no. 5, mai 1998, pages 781-789, XP002076399 ---	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. e internationale No

PCT/FR 98/02667

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2706487 A	23-12-1994	AUCUN	